



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA ACADÊMICA**  
**COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS**

**Fabiana América Silva Dantas de Souza**

**BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL POR**  
***Candida lipolytica* EM ÁGUA DO MAR**

**Recife**

**2009**

**Fabiana América Silva Dantas de Souza**

**BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL POR  
*Candida lipolytica* EM ÁGUA DO MAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Informática, Modelagem e Controle de Processo.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Clarissa Daisy da Costa Albuquerque

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alexandra Amorim Salgueiro

**Recife**

**2009**

S729b

Souza, Fabiana América Silva Dantas de  
Biodegradação de óleo diesel por candida lipolytica em água  
do mar / Fabiana América Silva Dantas de Souza : orientador  
Clarissa Daisy da Costa Albuquerque ; co-orientador Alexandra  
Amorim Salgueiro, 2009.  
158 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco.  
Pró-reitoria Acadêmica. Coordenação Geral de Pós-graduação.  
Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2009.

1. Biodegradação. 2. Biossurfactantes. 3. Candida lypolitica.  
4. Diesel - Biodegradação. 5. Água do mar. I. Título.

CDU 628.16

**FABIANA AMÉRICA SILVA DANTAS DE SOUZA**

**BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL POR  
*Candida lipolytica* EM ÁGUA DO MAR**

Dissertação apresentada à Universidade Católica de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

**APROVADA em: 15/04/2009**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mabel Hanna Vance-Harrop**

Examinador Externo

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Galba Maria de Campos-Takaki**

Examinador Interno

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarissa Daisy da Costa Albuquerque**

Orientadora

DEDICATÓRIA

A todos que, mesmo com um simples gesto, ajudaram-me a concluir mais uma jornada

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Clarissa Daisy da Costa Albuquerque, símbolo de inteligência, pela amizade, ensinamentos e extrema dedicação, e por acreditar no meu trabalho e na minha vontade de aprender.

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alexandra Amorim Salgueiro, símbolo de sabedoria, pela extrema dedicação e atenção, além dos seus ensinamentos científicos, por passar tranqüilidade e segurança.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Galba Maria de Campos Takaki, Coordenadora do Mestrado e Desenvolvimento de Processos Ambientais, que me deu a oportunidade de trabalhar num laboratório com tantos recursos, dando votos de confiança para a realização deste trabalho.

À minha família, que acompanhou minha batalha diariamente, pelo apoio, incentivo e compreensão das minhas ausências.

Aos colegas do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais e aos colegas Mestrandos e Doutorandos da UFPE e do RENORBIO, pelo companheirismo, amizade, troca de conhecimentos e aprendizado.

Aos alunos do PIBIC, estagiários da iniciação científica, Secretária e Técnicos do NPCIAMB pela paciência e apoio.

Aos que fazem parte da Secretaria da Pós-graduação pela atenção e gentileza no atendimento prestado durante o curso.

Ao Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, Prof<sup>o</sup> Dr. Pe. Pedro Rubens Ferreira Oliveira, S.J., pelo acesso e utilização das instalações do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais – NPCIAMB

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xiv
<b>RESUMO</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	1
<b>1.1 Introdução</b> .....	1
<b>1.2 Objetivos</b> .....	4
1.2.1 Objetivo geral .....	4
1.2.2 Objetivos específicos .....	4
<b>1.3 Revisão da literatura</b> .....	5
1.3.1 Hidrocarbonetos do petróleo .....	5
1.3.1.1 Caracterização .....	5
1.3.1.2 Classificação dos óleos .....	7
1.3.1.3 Óleo diesel .....	8
1.3.1.3.1 Diesel brasileiro .....	9
1.3.2 Água do mar .....	9
1.3.2.1 Caracterização físico-química da água do mar .....	10
1.3.3 Transporte de hidrocarbonetos e derramamentos marinhos .....	12
1.3.4 Comportamento de hidrocarbonetos no ambiente marinho .....	13
1.3.5 Conseqüências dos derramamentos de hidrocarbonetos .....	16
1.3.6 Medidas preventivas para derramamentos de hidrocarbonetos no mar .....	20
1.3.7 Processos de remediação .....	21
1.3.7.1 Remediação físico-química .....	21
1.3.7.2 Biorremediação .....	22
1.3.8 Surfactantes .....	25
1.3.8.1 Biossurfactantes .....	27
1.3.9 Produção de bioemulsificantes/biossurfactantes em meios a base de água do mar por <i>Candida lipolytica</i> .....	29
1.3.10 Atividade enzimática em ambientes contaminados por hidrocarbonetos .....	35
1.3.10.1 Degradação de compostos fenólicos por lacases e tanases .....	38
1.3.10.2 Atividade lipolítica em ambientes contaminados por óleo diesel .....	40
<b>1.4 Referências bibliográficas</b> .....	42

<b>CAPÍTULO 2 Biodegradação de óleo diesel por <i>Candida lipolytica</i> em água do mar</b> .....	58
<b>Resumo</b> .....	59
<b>Abstract</b> .....	60
<b>Introdução</b> .....	61
<b>Material e Métodos</b> .....	66
Microrganismo e meio de preservação .....	66
Óleo diesel .....	66
Água do mar .....	67
Determinação da salinidade .....	67
Quantificação microbiana .....	67
Determinação de atividade de emulsificação .....	68
Determinação do índice de emulsificação e da estabilidade da emulsão .....	69
Determinação da tensão superficial .....	69
Planejamentos experimentais dos meios de produção .....	69
Planejamento experimental 1 - Avaliação dos efeitos das concentrações de óleo diesel e dos componentes do meio de produção sobre a atividade de emulsificação e a tensão superficial .....	71
Planejamento experimental 2 - Avaliação dos efeitos das concentrações da água do mar e dos componentes do meio de produção sobre a atividade de emulsificação e a tensão superficial .....	72
Planejamento experimental 3 - Avaliação dos efeitos do pH inicial e dos componentes do meio de produção sobre a atividade de emulsificação e a tensão superficial .....	73
Ensaio de biodegradação .....	73
Deteção qualitativa de tanases.....	74
Determinações quantitativas de atividades enzimáticas .....	75
Determinação enzimática de lacases .....	75
Determinação enzimática de tanases .....	76
Determinação enzimática de lípases .....	77
<b>Resultados e Discussão</b> .....	78
Planejamentos experimentais dos meios de produção .....	79
Planejamento experimental 1 .....	80
Efeitos das concentrações de óleo diesel e dos componentes do meio de produção sobre a atividade de emulsificação .....	80
Efeitos das concentrações de óleo diesel e dos componentes do meio de produção	

obre a tensão superficial .....	81
Identificação dos melhores meios para produção de bioemulsificantes/ biosurfactantes .....	81
Planejamento experimental 2 .....	85
Efeitos da concentração da água do mar e dos componentes do meio de produção sobre a atividade de emulsificação .....	86
Efeitos da concentração da água do mar e dos componentes do meio de produção sobre a tensão superficial .....	86
Identificação dos melhores meios para produção de bioemulsificantes/ biosurfactantes .....	87
Planejamento experimental 3 .....	90
Efeitos do pH inicial e das concentrações dos componentes do meio de produção sobre a atividade de emulsificação .....	91
Efeitos do pH inicial e das concentrações dos componentes do meio de produção sobre a tensão superficial .....	91
Efeitos do pH inicial e das concentrações dos componentes do meio de produção sobre a concentração celular com 120 horas de cultivo .....	92
Efeitos do pH inicial e das concentrações dos componentes do meio de produção sobre o pH final .....	93
Efeitos do pH inicial e das concentrações dos componentes do meio de produção sobre a salinidade .....	93
Identificação dos melhores meios para produção de bioemulsificantes/ biosurfactantes e degradação de óleo diesel por <i>C. lipolytica</i> .....	94
Ensaio de Biodegradação .....	98
Perfis de crescimento celular, pH, salinidade e produção de bioemulsificante/biosurfactante .....	99
Perfis de estabilidade de emulsões formadas com óleo de milho e com óleo de motor .	104
Detecção qualitativa de tanases .....	105
Determinações quantitativas de atividades enzimáticas .....	106
Determinação enzimática de lacases .....	106
Determinação enzimática de tanases .....	108
Determinação enzimática de lipases .....	110
<b>Referências</b> .....	114
<b>Anexos</b> .....	126
<b>Conclusões gerais</b> .....	158

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figura 1.3.2.1.1	Principais sais presentes na água do mar .....	10
------------------	--	----

### Capítulo 2

Figura 1	Diagrama de Pareto para 1º planejamento fatorial $2^4$ tendo como variáveis independentes as concentração de (1) diesel, (2) uréia, (3) sulfato de amônia e (4) fosfato de potássio e como variável resposta a atividade de emulsificação para emulsões água em óleo de milho .....	140
Figura 2	Diagrama de Pareto para 1º planejamento fatorial $2^4$ tendo como variáveis independentes as concentração de (1) diesel, (2) uréia, (3) sulfato de amônia e (4) fosfato de potássio e como variável resposta a tensão superficial .....	141
Figura 3	Diagrama de Pareto para 2º planejamento fatorial $2^4$ tendo como variáveis independentes as concentração de (1) água do mar, (2) uréia, (3) sulfato de amônia e (4) fosfato de potássio e como variável resposta a atividade de emulsificação para emulsões água em óleo de milho .....	142
Figura 4	Diagrama de Pareto para 2º planejamento fatorial $2^4$ tendo como variáveis independentes as concentração de (1) água do mar, (2) uréia, (3) sulfato de amônia e (4) fosfato de potássio e como variável resposta a tensão superficial .....	143
Figura 5	Diagrama de Pareto para 3º planejamento fatorial $2^3$ tendo como variáveis independentes (1) pH inicial, (2) sulfato de amônia e (3) fosfato de potássio e como variável resposta a atividade de emulsificação para emulsões água em óleo de milho .....	144
Figura 6	Diagrama de Pareto para 3º planejamento fatorial $2^3$ tendo como variáveis independentes (1) pH inicial, (2) sulfato de amônia e (3) fosfato de potássio e como variável resposta a tensão superficial .....	145
Figura 7	Diagrama de Pareto para 3º planejamento fatorial $2^3$ tendo como variáveis independentes (1) pH inicial, (2) sulfato de amônia e (3) fosfato de potássio e como variável resposta a concentração celular com 120 h de cultivo .....	146

Figura 8	Diagrama de Pareto para 3º planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> tendo como variáveis independentes (1) pH inicial, (2) sulfato de amônia e (3) fosfato de potássio e como variável resposta o pH final .....	147
Figura 9	Diagrama de Pareto para 3º planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> tendo como variáveis independentes (1) pH, (2) sulfato de amônia e (3) fosfato de potássio e como variável resposta a salinidade .....	148
Figura 10	Cultivos de <i>C.lipolytica</i> crescida durante 120 h, a 28 °C e 150 rpm, em água do mar natural suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo e tendo óleo diesel como única fonte de carbono, (a) meio 1 (pH inicial 4); (b) meio 4 (pH inicial 10) e (c) meio 10 (pH inicial 7) .....	149
Figura 11	Cultivos de <i>C.lipolytica</i> crescida durante 120 h, a 28 °C a 150 rpm, em água do mar natural suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo e tendo óleo diesel como única fonte de carbono, em pH 10,0. (a) Cultivo com microrganismo (b) Controle – cultivo sem microrganismo .....	150
Figura 12	Crescimento de <i>C.lipolytica</i> em diferentes condições de cultivo: (C1) Água do mar + óleo diesel - composição idêntica a do ensaio 4 do terceiro planejamento; (C2) Água destilada + óleo diesel; (C3) Água do mar + óleo de milho; (C4) Água destilada + óleo de milho .....	151
Figura 13	Perfis de (a) crescimento, tensão superficial, salinidade e (b) pH e atividades de emulsificação para óleo de milho e óleo de motor da levedura <i>C. lipolytica</i> UCP 988 crescida em água do mar tendo óleo diesel como única fonte de carbono. Perfis de (c) crescimento, tensão superficial, salinidade e (d) pH e atividades de emulsificação para óleo de milho e óleo de motor da levedura <i>C.lipolytica</i> UCP 988 crescida em água destilada tendo óleo de milho como única fonte de carbono .....	152
Figura 14	Perfis de (a) crescimento, tensão superficial, salinidade e (b) pH e atividades de emulsificação para óleo de milho e óleo de motor da levedura <i>C.lipolytica</i> UCP 988 crescida em água do mar tendo óleo de milho como única fonte de carbono. Perfis de (c) crescimento, tensão superficial, salinidade e (d) pH e atividades de emulsificação para óleo de milho e óleo de motor da levedura	

	<i>C. lipolytica</i> UCP 988 crescida em água destilada tendo óleo de milho como única fonte de carbono .....	153
Figura 15	Curvas de estabilidade dos índices de emulsificação de emulsões formadas entre o cultivo de 96 horas livre de células de <i>C. lipolytica</i> UCP 988 - nas condições C1, C2, C3 e C4 - e óleo de milho ou óleo de motor .....	154
Figura 16	Deteção qualitativa de tanase em amostras de líquidos metabólicos de <i>C. lipolytica</i> crescida em água do mar suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo, usando óleo diesel como única fonte de carbono .....	155
Figura 17	Cinética de Produção de Lacase por <i>C. lipolytica</i> UCP 988 nas condições: (C1) Água do mar + óleo diesel; (C2) Água destilada + óleo diesel; (C3) Água do mar + óleo de milho e (C4) Água destilada + óleo de milho .....	156
Figura 18	Cinética de Produção de Tanase por <i>C. lipolytica</i> UCP 988 nas condições: (C1) Água do mar + óleo diesel; (C2) Água destilada + óleo diesel; (C3) Água do mar + óleo de milho e (C4) Água destilada + óleo de milho .....	157

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1.3.1.2.1	Caracterização de óleos e derivados em função da persistência no ambiente .....	8
Tabela 1.3.2.1.1	Composição iônica da água do mar .....	11
Tabela 1.3.4.1	Porcentagem de petróleo evaporado em função do tempo e da temperatura .....	14
Tabela 1.3.5.1	Efeitos do derrame de petróleo em comunidades biológicas .....	19
Tabela 1.3.7.1.1	Tecnologias de tratamentos por processos físico-químicos .....	22
Tabela 1.3.8.1.1	Aplicações para tensoativos não-iônicos em relação aos valores de BHL (Balanço hidrofílico-lipofílico) .....	27
Tabela 1.3.8.1.2	Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores .....	29

### Capítulo 2

Tabela 1	Caracterização físico-química de água do mar .....	127
Tabela 2	Composição iônica dos seis principais sais presentes na água do mar .....	128
Tabela 3	Níveis e valores das variáveis independentes (ou fatores) do 1º planejamento fatorial completo $2^4$ .....	129
Tabela 4	Níveis e valores das variáveis independentes (ou fatores) do 2º planejamento fatorial completo $2^4$ .....	130
Tabela 5	Composições dos meios de crescimento dos inóculos do 2º planejamento fatorial .....	131
Tabela 6	Níveis e valores das variáveis independentes (ou fatores) do 3º planejamento fatorial completo $2^3$ .....	132
Tabela 7	Matriz do 1º planejamento fatorial completo $2^4$ decodificada e resultados de atividade de emulsificação (AE) para emulsão água-em-óleo de milho, tensão superficial (TS), pH e salinidade de filtrados livres de células, com 168 h de cultivo .....	133

Tabela 8	Matriz do 2º planejamento fatorial completo $2^4$ descodificada e resultados da atividade de emulsificação para emulsão água-em-óleo de milho (AEM), água em-hexadecano (AEH) e água-em-óleo diesel (AED) e tensão superficial (TS) de filtrados livres de células, com 168 h de cultivo ..... 134
Tabela 9	Matriz do 3º planejamento fatorial completo $2^3$ descodificada e resultados de concentração celular do cultivo (CPML) com 120 h, atividade de emulsificação (AE) para emulsão água-em-óleo de milho, tensão superficial (TS), pH final, salinidade (SAL) de cultivos de 120 horas livres de células. O pH inicial dos cultivos é fornecido na primeira coluna da tabela ..... 135
Tabela 10	Perfis cinéticos da levedura <i>C. lipolytica</i> cultivada sob diferentes condições nutricionais: (1) Água do mar + óleo diesel - composição idêntica a do ensaio 4 do terceiro planejamento; (2) Água destilada + óleo diesel; (3) Água do mar + óleo de milho; (4) Água destilada + óleo de milho ..... 136

## LISTA DE ABREVIATURAS

API	American Petroleum Institute
ASTM	American Society for Testing and Materials
BHL	Balanço Hidrofílico-Lipofílico
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CMC	Concentração Micelar Crítica
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DE	Densidade Específica
FRONAPE	Frota Nacional de Petroleiros
HAPs	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
MARPOL	Convenção Internacional para a Prevenção da Poluição por Navios.
OILPOL	Convenção Internacional para a Prevenção da Poluição por Óleo
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PET	<i>Polyethylene terephthalate</i>
POP	Poluentes Orgânicos Persistentes
POY	<i>Partially Oriented Yarn</i>
PTA	<i>Purified Terephthalic Acid</i>
TRANSPETRO	Petrobras Transporte AS
YMA	<i>Yeast Malt Agar</i>
YSW-B2	<i>Yeast Salt Water-Bababassu 2</i>
YSW-B3	<i>Yeast Salt Water-Bababassu 3</i>
YWS-C	<i>Yeast Salt Watter-Corn</i>
YWS-C1	<i>Yeast Salt Watter-Corn 1</i>

## RESUMO

A biodegradação de hidrocarbonetos por população natural de microrganismos representa um dos mecanismos primários pelos quais óleo diesel e outros hidrocarbonetos poluentes são eliminados ou transformados no ambiente. Atualmente aceita-se que hidrocarbonetos de petróleo possam ser degradados por microrganismos, desde que alguns fatores, tais como nutrientes, disponibilidade de compostos orgânicos, pH e temperatura sejam controlados e otimizados. Neste estudo, biodegradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* em água do mar suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo foi investigada em escala de frascos de fermentação agitados. Um conjunto de três planejamentos fatoriais completos foi realizado para investigar os efeitos e as interações do pH e das concentrações de água do mar, óleo diesel, uréia, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio sobre o crescimento de *C. lipolytica*, a atividade emulsificação e a tensão superficial do cultivo livre de células. A biodegradação de óleo diesel foi confirmada através de quatro experimentos na presença de: (1) água do mar + óleo diesel (2); água destilada + óleo diesel; (3) + água do mar + óleo de milho (4) água destilada + óleo de milho. O melhor resultado para degradação de óleo diesel 5% (v/v) foi obtido, utilizando água do mar suplementada com 1,0% (p/v) de sulfato de amônio e 1,0% (p/v) de fosfato monobásico de potássio. Nesta condição, após 96 h, o pH, a salinidade, a tensão superficial e as atividades de emulsificação para emulsões com óleo de milho e com óleo de motor foram iguais a 9,47, 44‰, 46,63 mN/m, 5,49 e 6,00 UAE, respectivamente. Considerando que a *C. lipolytica* tem potencial de aplicação em processos biotecnológicos, as condições dos meios de produção e os bioemulsificantes e biossurfactantes produzidos são candidatos a serem otimizados e utilizados na biorremediação de ambientes marinhos contaminados por óleo diesel e outros derivados de petróleo.

**Palavras chaves:** biodegradação, óleo diesel, água do mar, *Candida lipolytica*, bioemulsificante, biossurfactante

## ABSTRACT

The biodegradation of hydrocarbons by natural population of microorganism represents one of the primary mechanisms by which diesel oil and others hydrocarbons pollutants are eliminated or transformed in the environment. It is generally accepted today that petroleum hydrocarbon, can be degraded by microorganisms as long as a few factors, such as nutrients, organic compound bioavailability, pH and temperature are controlled and optimized. In this study biodegradation of diesel oil by *Candida lipolytica* in sea water supplemented with nitrogen and phosphorus sources was investigated in shake flask fermentation scale. A set of three full factorial designs was carried out to investigate the effects and interactions of pH and the seawater, diesel oil, urea, ammonium sulfate and potassium dihydrogen orthophosphate concentrations on the *C. lipolytica* growth, the emulsification activity and the surface tension of the free cell broth. The biodegradation of diesel oil was confirmed through four laboratory experiments using: (1) seawater + diesel oil; (2) distilled water + diesel oil; (3) seawater + corn oil and (4) distilled water + corn oil. The best result for 5% (v/v) diesel degradation was obtained at condition 1, using seawater supplemented with 1,0% (p/v) of ammonium sulfate and 1,0 % (p/v) of potassium dihydrogen orthophosphate. In this condition, after 96 h, the pH, the salinity, the surface tension and the emulsification activities to emulsions with corn oil and with motor oil were equal to 9.47, 44 ‰, 46.63 mN/m, 5.49 e 6.00 UAE, respectively. Whereas *C. lipolytica* has potential application in biotechnological process, the production medium conditions and bioemulsifiers and biosurfactants produced are candidates to be optimized and used in bioremediation of marine environments contaminated by diesel and other oil products.

**Key-words:** biodegradation, diesel oil, seawater, *Candida lipolytica*, bioemulsifier, biosurfactant

## CAPÍTULO 1

### 1. Introdução

Acidentes durante o transporte marítimo de petróleo e seus derivados têm causado sérios danos ao meio ambiente, demonstrando a importância e a necessidade de pesquisa, desenvolvimento e aperfeiçoamento de tecnologias de prevenção e remediação de derrames de óleos operacionais ou acidentais.

A instalação da Refinaria Abreu e Lima, prevista para entrar em funcionamento em 2011, no Porto de Suape, Pernambuco, provavelmente aumentará a incidência de problemas ambientais decorrentes do derramamento de petróleo e derivados, pois irá processar óleos pesados extraídos no Brasil e na Venezuela. Também será instalado, em Suape, um pólo petroquímico integrado pela maior fábrica de resina polietileno tereftalato (PET), por uma indústria de ácido tereftálico purificado (PTA) e por uma unidade industrial de polímeros e filamentos de poliéster (POY). A incidência de problemas ambientais decorrentes do derramamento de petróleo e derivados, provavelmente aumentará, com o início da operação deste Complexo Petroquímico.

As técnicas convencionais de limpeza de áreas contaminadas com petróleo e seus derivados podem ser complementados com a remediação, pelo uso de dispersantes químicos ou de biossurfactantes (BENTO, 2005). Comparados aos surfactantes sintéticos, os biossurfactantes têm maior tolerância à variação de pH, temperatura e salinidade, são mais seletivos, menos tóxicos, biodegradáveis, existindo ainda a possibilidade de serem produzidos *in situ* pelos microrganismos, que se utilizariam dos contaminantes orgânicos como substratos para crescimento (DESAI; BANAT, 1997).

A biodegradação do petróleo e seus derivados por populações naturais de microrganismos representa um dos mecanismos primários através dos quais compostos poluentes podem ser eliminados do meio ambiente. Alguns compostos do petróleo são facilmente evaporados ou biodegradados, enquanto outros persistem recalcitrantes na

natureza. Processos de biorremediação minimizam o impacto de substâncias recalcitrantes no ambiente (ATLAS, 1997; 1981).

O crescimento de microrganismos em uma interface de óleo/água favorece o aparecimento de um biofilme, cuja formação envolve as seguintes etapas: primeiro os microrganismos aderem à superfície de grandes gotas de óleo devido à hidrofobicidade das células, em seguida as células aderidas formam uma camada delgada na interface óleo/água, extraindo os compostos insolúveis em água da fase oleosa e utilizando os sais minerais da fase aquosa. Quando as células revestem as gotas de óleo produzindo biossurfactantes, a tensão interfacial disponível é reduzida favorecendo o crescimento microbiano. Quando o composto oleoso contido nas gotas desaparece, os microrganismos colonizam outras gotas (BENTO, 2005).

E é justamente nestes compostos oleosos provenientes da indústria petrolífera, onde está concentrado o maior mercado para os biossurfactantes. Em torno de 400-500 toneladas/ano de biossurfactantes produzidos são usados na produção do petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes, além de outras aplicações na área petrolífera, incluindo a biorremediação e dispersão no derramamento de óleos; a remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem e a recuperação terciária de petróleo (PIRÔLLO, 2006).

As refinarias de petróleo geram uma grande quantidade de derivados indesejáveis que poluem o ambiente e são os principais poluidores do solo e mananciais de água. As fontes destes produtos são provenientes principalmente dos fundos de tanques-reservatórios e das unidades de tratamento. No Brasil, as regiões costeiras estão mais suscetíveis a derramamentos de petróleo e seus derivados uma vez que são nas operações realizadas nos portos e terminais que têm sido registrados os maiores índices de acidentes, cerca de 90,8% do total (SILVA, 2004).

Um derrame de óleo pode gerar uma série de impactos sobre os organismos e os ecossistemas, prejudicando atividades recreativas como banho de mar, mergulho, pescaria, além de gerar contestações por parte da população, comércio (hotéis, restaurantes, turismo), governo local, indústrias que usem recursos do mar e outros setores da sociedade que se utilizam do ambiente poluído (KHANNA; BARUA, 2001).

A poluição ambiental causada pela liberação de hidrocarbonetos, decorrentes das atividades industriais e dos derramamentos acidentais de petróleo e seus derivados, apresenta grande risco aos ecossistemas marinho e terrestre. Os tratamentos tradicionais, tais como contenção e recolhimento através de barreiras flutuantes, adsorção por materiais naturais ou sintéticos, entre outros, não visam à degradação do petróleo (PIRÔLLO, 2006).

A limpeza de locais marítimos e terrestres contaminados por derramamento de petróleo, remoção da borra oleosa de tanques de estocagem, remoção de metais pesados de solos e córregos contaminados, assim como o aumento geral nos processos de recuperação de óleo de reservatórios, são possíveis aplicações para biossurfactantes (VANDYKE et al., 1991).

A biodegradação apresenta-se como um método efetivo, uma vez que, o petróleo é usado como fonte de carbono através dos processos microbianos, resultando na quebra das moléculas em compostos de baixa massa molecular (ZHANG et al., 2005). Porém, geralmente a biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos para conversão microbiana é baixa, limitando assim a taxa de biodegradação no meio aquoso. Sendo assim, o uso de compostos tensoativos, tal como compostos surfactantes, apresenta-se como uma alternativa à biodegradação de hidrocarbonetos (URUM et al., 2004; PIRÔLLO, 2006).

Diante desses cenários, apoiado em legislações de caráter ambiental e conscientes da necessidade inovações tecnológicas, em especial tecnologias "verdes" para prevenção e remediação de acidentes, envolvendo petróleo e derivados, grupos de pesquisadores da Universidade Federal de Pernambuco e da Universidade Católica de Pernambuco vêm se dedicando há vários anos ao desenvolvimento de novos processos produtos biotecnológicos com vista à preservação e remediação de ambientes contaminados por petróleo e derivados (VANCE-HARROP, 2000; VANCE-HARROP; BUARQUE-GUSMÃO; CAMPOS-TAKAKI, 2000; SARUBBO et al., 2001; VANCE-HARROP; CAMPOS-TAKAKI, 2001; VANCE-HARROP; BUARQUE-GUSMÃO; CAMPOS-TAKAKI, 2003; VANCE-HARROP, 2004; ALBUQUERQUE, et al., 2005; ALBUQUERQUE, 2006; ALBUQUERQUE; FILETI; CAMPOS-TAKAKI, 2006, ALBUQUERQUE et al., 2008).

Portanto, considerando a escassez e a necessidade de novas pesquisas sobre biodegradação de hidrocarbonetos e produção de bioemulsificantes e/ou biossurfactantes, em ambientes marinhos impactados por derramamentos de petróleo e derivados, o presente trabalho teve como objetivo investigar a degradação de óleo diesel e a produção de bioemulsificante/biossurfactante por *C. lipolytica* UCP 0988 em água do mar.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade da levedura *Candida lipolytica* UCP 0988 degradar óleo diesel em água do mar natural, suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo.

### 1.2.2 Objetivos específicos

1. Investigar a capacidade de *C. lipolytica* crescer em água do mar natural, suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo, tendo óleo diesel como única fonte de carbono;
2. Investigar a produção de bioemulsificantes/biossurfactantes por *C. lipolytica*, em água do mar natural, suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo, tendo óleo diesel como única fonte de carbono;
3. Avaliar os efeitos da concentração de óleo diesel, da concentração de água do mar, das concentrações de nutrientes (uréia, do sulfato de amônio e do fosfato monobásico de potássio) e do pH sobre o crescimento de *C. lipolytica*;
4. Avaliar os efeitos da concentração de óleo diesel, da concentração de água do mar, das concentrações de nutrientes (uréia, do sulfato de amônio e do fosfato monobásico de potássio) e do pH sobre a atividade de emulsificação e a tensão superficial de cultivos livres de células de *C. lipolytica*;
5. Avaliar a estabilidade e especificidades do(s) bioemulsificante(s)/biossurfactante(s) produzido(s) frente a diferentes condições de pH e salinidade;
6. Investigar a capacidade da levedura *C. lipolytica* produzir fenoloxidasas (lacases), tanases e lipases em água do mar natural, suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo, tendo óleo diesel como única fonte de carbono.

## 1.3 Revisão da literatura

A presente revisão teve como propósito fornecer uma visão geral sobre hidrocarbonetos, derramamentos marinhos e suas conseqüências, ressaltando ainda a degradação enzimática de compostos aromáticos por lacases e tanases, além de técnicas de biorremediação de hidrocarbonetos do petróleo, e produção de biossurfactante e/ou bioemulsificantes, em ambientes marinhos e em meios minerais a base de água do mar natural, tendo como substrato hidrocarbonetos e óleos vegetais.

### 1.3.1 Hidrocarbonetos do petróleo

#### 1.3.1.1 Caracterização

Os hidrocarbonetos são utilizados como indicadores de poluição por serem os compostos mais abundantes do petróleo. São formados por carbono e hidrogênio, 85% e 15%, respectivamente, e possuem composição e estruturas moleculares diferenciadas. Baseados na composição molecular podem ser agrupados em quatro classes principais, aromáticos, alcanos, alcenos e cicloalcanos. Os hidrocarbonetos aromáticos ou hidrocarbonetos de cadeia benzênica (insaturada) são os que apresentam maior toxicidade. A biodegradação é lenta e estão associados a efeitos crônicos e carcinogênicos. Aqueles com dois ou mais anéis aromáticos são denominados de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs), também classificados como Poluentes Orgânicos Persistentes (POP). Constituem os principais produtos da combustão incompleta da matéria orgânica, sendo potencialmente perigosos e amplamente distribuídos pelo meio ambiente na forma de misturas complexas. Alguns HAPs são mutagênicos ou carcinogênicos, com atividade dependente de sua forma molecular (SILVA, 2004).

Os alcanos, hidrocarbonetos de cadeias simples e ramificadas, conhecidos como parafinas, compreendem a maior fração da maioria dos petróleos. São incolores, relativamente inodoros e pouco reativos. A toxicidade dos mesmos geralmente é baixa e são facilmente biodegradados. Enquanto que os alcenos (olefinas) caracterizam-se por hidrocarbonetos de cadeia aberta, bem similar aos alcanos, diferindo apenas pela presença de ligação dupla entre os átomos de carbono. Geralmente estão ausentes ou aparecem em pequenas quantidades no petróleo, mas são abundantes em produtos de refino como a

gasolina. Já os hidrocarbonetos de cadeias fechadas (cíclicas) e saturadas, são admitidos quimicamente como cicloalcanos (naftas), fazem parte da segunda maior fração da maioria dos petróleos, e apresentam toxicidade variável de acordo com sua estrutura molecular, além do que são hidrocarbonetos resistentes à biodegradação.

Essencialmente, os mesmos hidrocarbonetos compõem os diferentes tipos de petróleo, variando apenas em suas proporções. Estas diferenças na composição influenciam nas propriedades físicas dos diversos tipos de petróleo cru, como por exemplo, a coloração, variando desde quase transparente até negro; o odor de quase inodoro até o forte cheiro de enxofre.

Os derivados de petróleo apresentam propriedades físicas semelhantes. Normalmente, não reagem quimicamente ou apresentam dificuldades de reação com agentes oxidantes ou redutores, não apresentando ação reativa ou corrosiva. Dentre estas propriedades temos: densidade, ponto de inflamação, ponto de fluidez, viscosidade, tensão superficial e solubilidade.

A densidade permite determinar se um óleo tende a afundar ou flutuar na coluna d'água após um vazamento. A gravidade específica indica a flutuabilidade de tais substâncias. Os óleos quando lançados no ambiente, geralmente permanecem flutuando até que se adsorvam a partículas em suspensão e sedimento, passando por intemperização adicional ou sejam consumidos por organismos vivos.

O ponto de inflamação é detectado pela temperatura na qual uma substância libera vapores (CETESB, 2004). Óleos leves e produtos refinados são inflamados com mais facilidade do que os óleos pesados. Com a gradual dispersão ou evaporação dos componentes leves e a conseqüente elevação do ponto de inflamação, os produtos vão se tornando menos perigosos para as equipes de limpeza.

O Ponto de Fluidez (Pour Point) é indicado pela "temperatura abaixo da qual o óleo não fluirá" (API, 1999), "devido a formação de uma estrutura microcristalina que amplia a viscosidade e tensão superficial do produto" (CETESB, 2002). O ponto de fluidez dos petróleos brutos situa-se entre a temperatura inferior a  $-30^{\circ}\text{C}$  para os mais fluidos e  $+30^{\circ}\text{C}$  para os mais ricos em parafina. Para os refinados, o ponto de fluidez pode variar entre  $-60^{\circ}\text{C}$  para combustíveis de avião e  $+46^{\circ}\text{C}$  para óleos combustíveis nº 6 (FRONAPE, 2002a; SILVA, 2004).

Entende-se por viscosidade a resistência interna de um fluido ao escoamento, devido às forças de atrito entre as moléculas. A viscosidade é inversamente proporcional à temperatura, ou seja, a viscosidade aumenta quando a temperatura diminui e vice-versa; varia de acordo com os teores dos componentes (leves, intermediários, pesados),

substâncias contendo maior parte de compostos leves são menos viscosas que aquelas contendo mais compostos intermediários e estas, por sua vez, são menos viscosas que substâncias contendo maior parte de componentes pesados. Um óleo sob processo de intemperização tem sua viscosidade natural aumentada com a perda de diversos componentes.

A tensão superficial constitui-se na força de atração (coesão) entre as moléculas na superfície de um líquido. A tensão superficial diminui com o aumento da temperatura e, juntamente com a viscosidade determinam a taxa de espalhamento da substância na água ou no solo (CETESB, 2004).

A solubilidade é o processo através do qual uma substância (soluto) dissolve-se em outra (solvente). Geralmente, não ultrapassando a 5 ppm, a solubilidade do petróleo em água é classificada como extremamente baixa e, dissolvem-se no meio aquático apenas uma pequena parte dos hidrocarbonetos solúveis e dos vários sais minerais presentes no óleo (POFFO, 2000).

### **1.3.1.2 Classificação dos óleos**

A classificação dos óleos é baseada na persistência do óleo no ambiente conforme peso específico e em função das propriedades. Ao entrar em contato com o ambiente, o produto derramado começa a sofrer contínuos processos físicos e químicos decorrentes das condições ambientais locais como ventos, temperatura, intensidade luminosa, ondas e correntes. Dependendo da natureza do produto derramado, este tenderá a desaparecer ao longo do tempo ou a persistir no ambiente. São classificados como não persistentes, os produtos refinados de petróleo que tendem a evaporar e dissipar rápida e naturalmente e que raramente requerem limpeza (ITOPF, 2003). Os persistentes são aqueles petróleos crus e produtos refinados que tendem a se dissipar mais vagarosamente.

Segundo o Código Federal Americano de Regulamentações 33 US, sub-parte 155.1020, os óleos são divididos em cinco categorias, especificadas na Tabela 1.3.1.2.1, baseado na persistência relativa dos mesmos.

Tabela 1.3.1.2.1 Caracterização de óleos e derivados em função da persistência no ambiente

<b>Categoria</b>	<b>Persistência</b>	<b>Densidade específica</b>	<b>Exemplos</b>
Grupo I	Não persistente	Não aplicáveis (N/A)*	Gasolina, condensados
Grupo II	Persistente	< 0,85	Diesel, óleo cru leve
Grupo III	Persistente	0,85 ≤ 0,95	Produtos e óleo cru intermediários
Grupo IV	Persistente	0,95 ≤ 1,00	Óleo cru pesado residual
Grupo V	Persistente	> 1,00	Mais pesados do que água doce

\* Por possuírem uma baixa densidade específica, os óleos do Grupo I são simplesmente listados como N/A.

Fonte: (API,1999 apud SILVA, 2004).

### 1.3.1.3 Óleo diesel

O óleo diesel é um subproduto do petróleo, constituído basicamente por hidrocarbonetos, que variam de 8 a 38 átomos de carbono em sua cadeia, aproximadamente 40% são de n-alcenos; 39%, de iso e cicloalcenos; 20%, de hidrocarbonetos aromáticos, e o restante é formado por isoprenóides como enxofre, oxigênio e nitrogênio. É um produto inflamável, medianamente tóxico, volátil, isento de material em suspensão e com odor forte e característico. Contudo, a composição de um óleo diesel específico dependerá da fonte do petróleo, do método de produção e dos processos de destilação. O óleo diesel pode também conter vários aditivos na sua composição final, tais como: inibidores de corrosão, surfactantes e aditivos para melhorar a estabilidade e a ignição (PETROBRAS, 2003).

Dos hidrocarbonetos totais de petróleo que compõem o óleo diesel, incluem-se os hidrocarbonetos policíclicoaromáticos (HPA), como naftaleno, metilnaftaleno, dimetilnaftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno, indeno(1,2,3-cd)pireno, e os monoaromáticos (BTEX), como benzeno, tolueno, etilbenzeno, o-xileno, m-xileno, p-xileno. (MAZZUCO, 2004)

### 1.3.1.3.1 Diesel brasileiro

Várias classes de diesel são disponíveis no mundo e a classificação difere de país para país (GAYLARDE et al., 1999). O diesel brasileiro é um combustível derivado do petróleo constituído basicamente por hidrocarbonetos alifáticos. É um produto inflamável, medianamente tóxico, volátil, límpido, isento de material em suspensão e com odor forte e característico. Sua cor varia de amarelo ao marrom, possuindo fluorescência azul. A composição química deste combustível é muito variável no que diz respeito à distribuição de hidrocarbonetos, que podem ser classificados em três tipos: parafinas, naftalenos e aromáticos para os produtos de destilação direta, aparecendo ainda as olefinas quando o óleo diesel contém produtos de craqueamento (CAMPOS; EPAMINONDAS, 1989). A distribuição destes diferentes tipos de hidrocarbonetos é muito importante porque afetam as propriedades do combustível. (PETRÓLEO BRASILEIRO, 2009; SONG, 2000).

No Brasil, uma introdução relativamente nova no mercado é a do diesel urbano (ou metropolitano) que tem o mais baixo nível de enxofre permitido (0,5% no máximo, um pouco mais alto que em outros países). Teor de enxofre reduzido pode permitir aumento da atividade microbiana. O óleo diesel é um combustível que sofre os mais variados problemas de contaminação microbiana (GAYLARDE et al., 1999). Existem dois tipos de óleo diesel comercializados no Brasil que se diferenciam basicamente pelo teor de enxofre. O processamento para se conseguir um teor máximo de 500 ppm para o diesel metropolitano (Diesel D) faz com que outras propriedades sejam alteradas em relação ao diesel comum (Diesel B). Com objetivo de reduzir impactos ambientais, o biodiesel está sendo adicionado ao óleo diesel. No Brasil desde 2005, foi autorizada a adição de biodiesel em quantidade de 2% ao diesel cujo percentual tornou-se obrigatório a partir de 2008, formando a mistura chamada de B2 (YAMAMOTO et al., 2007).

### 1.3.2 Água do mar

As águas marítimas representam um sistema complexo de manutenção de milhões de formas de vida, mas a poluição vem prejudicando sua plena atividade enquanto ecossistema, pois está possibilitando o rompimento do curso evolutivo de muitas espécies, bem como colocando em risco eminente de extinção muitas outras.

O estudo da poluição química nos mares e oceanos é de fundamental importância para a sociedade. E para melhor entender os danos causados ao ambiente marítimo pelos derramamentos de petróleo e seus derivados, faz-se necessário um conhecimento mais aprofundado dos componentes constituintes da água do mar, bem como suas propriedades.

### 1.3.2.1 Características físico-químicas da água do mar

A água do mar contém quase todos os elementos, do hidrogênio ao urânio, e é composta por 96,7% de água e 3,3 % de sais dissolvidos. A densidade da água salgada na superfície do mar varia de 1020 a 1029 kg m<sup>-3</sup>, dependendo da temperatura e salinidade. Em oceano profundo, sob alta pressão, a água do mar pode chegar a uma densidade de 1050 kg m<sup>-3</sup> ou superior. O pH da água do mar é limitado ao intervalo de 7,5 a 8,4. A água do mar é composta por 96,5% de água e 3,5% de sais (JONES, 1999). Apenas sete elementos respondem por cerca de 93,5% dos sais dissolvidos, todos em sua forma iônica (Figura 1.3.2.1.1).

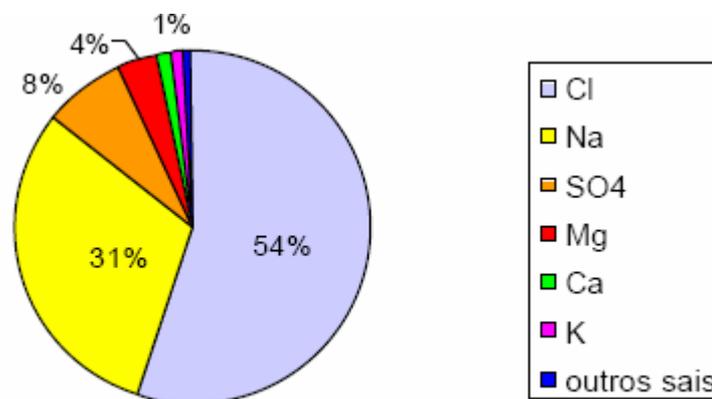


Figura 1.3.2.1.1 Principais sais presentes na água do mar. (Fonte: Matsuura 2001)

A composição da água do mar é única se comparada com outros sistemas aquosos naturais, e os principais fatores de diferenciação são: a alta concentração de soluto e a baixa flutuação geográfica da concentração.

Embora os mares e oceanos estejam sujeitos aos movimentos oriundos dos ciclos hidrológicos que promovem precipitações ou dissoluções de diferentes solutos, em diferentes tempos, a água do mar apresenta características de concentração aproximadamente constantes, tanto em sua profundidade quanto em sua extensão (LIBES, 1992).

A constância relativa das concentrações dos íons é conhecida como Princípio de Marcet ou Regra das Proporções Constantes. Formalmente, isto quer dizer que, embora a salinidade possa variar de um lugar para o outro, as relações entre as quantidades dos íons majoritariamente presentes na água do oceano aberto são aproximadamente constantes. Essas proporções são constantes porque a taxa de movimentação de massa no interior dos oceanos supera, em rapidez, os processos químicos que possam conduzir à remoção ou ao suprimento dos íons. Os fenômenos de transporte podem alterar a concentração local da água do mar, mas não a abundância relativa dos principais íons presentes no sistema (Tabela 1.3.2.1.1).

Tabela 1.3.2.1.1 Composição iônica da água do mar

Íon	g.kg <sup>-1</sup> de água(35‰)	g/Kg/Cl‰
Cl <sup>-</sup>	19,344	-
Na <sup>+</sup>	10,733	0,556
(SO <sub>4</sub> ) <sup>2-</sup>	2,712	0,1400
Mg <sup>2+</sup>	1,294	0,0668
Ca <sup>2+</sup>	0,412	0,02125
K <sup>+</sup>	0,399	0,02060
Br <sup>-</sup>	0,0674	0,00348
Sr <sup>2+</sup>	0,0079	0,00041
B <sup>3+</sup>	0,00445	0,00023
F <sup>-</sup>	0,00128	6,67x10 <sup>-5</sup>

Fonte: LIBES, 1992

O parâmetro salinidade (Equação 1) usado para expressar a quantidade de sais contida na água do mar representa a quantidade total (em gramas) de sais dissolvidos presentes em um quilograma de água:

$S(\text{‰}) = (\text{g íons inorgânicos dissolvidos}/1 \text{ kg de água do mar}) * 1000 \text{ (1)}$

O valor aproximado da salinidade da água do mar gira em torno de 35 g/kg, também expresso com 35 ‰ ou 35 ppt (parts per thousand/partes por mil). Atualmente, acredita-se que os sais dissolvidos na água do mar são oriundos de três fontes principais: erupções vulcânicas, reações químicas entre a água do mar e rochas vulcânicas recém-formadas a partir de zonas de espalhamento de lavas (LIBES, 1992).

### 1.3.3 Transporte de hidrocarbonetos e derramamentos marinhos

O transporte marítimo de hidrocarbonetos no Brasil é realizado pelos navios petroleiros, que atuam tanto na navegação de longo curso como na navegação de cabotagem ao longo de toda a costa brasileira. A interligação com a terra é feita através dos terminais marítimos, distribuídos ao longo de toda a costa, que representam peças-chave nesta cadeia logística.

Uma vez que o petróleo e seus derivados respondem pela maior parte dos granéis líquidos transportados pela costa brasileira e pelos mares do mundo, os impactos advindos da navegação tornam-se relevantes. Em números, os petroleiros transportam cerca de 1.800 milhões de toneladas de óleo cru pelo mundo ao ano. (IMO, 2004). Em termos percentuais o petróleo e seus derivados respondem por cerca de 40% do comércio marítimo mundial (INTERTANKO, 2003).

A atividade de transporte de petróleo e derivados tem grande potencial poluidor, principalmente devido ao grande volume em operação. O transporte de petróleo e derivados pode causar descargas de portes variáveis, desde as maiores proporcionadas por acidentes com petroleiros até as relativamente pequenas, mas freqüentes, por descargas operacionais. Mundialmente, esse transporte lança no ambiente cerca de 100.000 toneladas de hidrocarbonetos por ano. Comparando a outras fontes de hidrocarbonetos, apenas as fontes antropogênicas, são responsáveis por cinquenta por cento do total de hidrocarbonetos lançados anualmente no meio ambiente. (WALKER et al., 2003).

A Frota Nacional de Petroleiros (FRONAPE), integrante do sistema PETROBRAS, é a maior transportadora de petróleo e derivados do Brasil (TRANSPETRO, 2004). Frotas e empresas como estas contribuem bastante para o risco de impacto ambiental resultante do

derramamento de cargas de petróleo e derivados para o mar, seja proveniente de um acidente ou durante operações rotineiras como carga e descarga.

### **1.3.4 Comportamento de hidrocarbonetos no ambiente marinho**

A conduta dos hidrocarbonetos no ambiente depende da interação de sua composição juntamente com os processos de intemperização sofridos por eles ao longo do tempo. Dentre esses processos pode-se destacar: espalhamento, evaporação, dispersão, dissolução, emulsificação, sedimentação, biodegradação e foto-oxidação. Cabe ressaltar que os processos ocorrem de forma simultânea, não havendo ligação entre o início de um e o término do anterior.

O espalhamento ocorre pelo movimento horizontal do óleo na superfície da água devido os efeitos da densidade, inércia, fricção, viscosidade e tensão superficial. Esse processo inicia-se imediatamente após o derrame e dura de sete a dez dias ou enquanto o óleo estiver sendo contido. Procede com grande rapidez nas primeiras horas (algumas centenas de metro/hora). Após os dois primeiros dias, o processo diminui sensivelmente devido à evaporação que torna o petróleo mais pesado e viscoso (SILVA, 2004).

As condições ambientais como vento e correntes agem diretamente no transporte do produto derramado pela superfície da água e na dissociação da mancha. O processo de espalhamento aumenta a mancha de óleo aumentando também a área de exposição ao ar, ao sol e o contato com a água do mar, permitindo, dessa forma, um incremento na eficiência de outros processos.

A evaporação é o processo de perda para atmosfera dos compostos leves e intermediários do petróleo e/ou derivados. Inicia-se imediatamente após o derrame e dura por aproximadamente duas semanas e em caso de compostos pesados, o processo pode permanecer atuando por até um ano quando o produto permanece no ambiente, embora a taxa de evaporação seja grandemente reduzida após a primeira semana. A evaporação desses compostos promove alterações na composição química do produto. Embora haja redução do volume derramado no decorrer desse processo, os compostos remanescentes têm viscosidade e densidade específicas altas, o que deixa a mancha mais espessa. Pode-se dizer que a evaporação é o primeiro processo que atua naturalmente na remoção do produto na superfície da água, sendo o mais importante neste aspecto durante as primeiras 24 a 48 horas. Dependendo da composição do produto, a evaporação pode ser responsável

pela redução de mais da metade do volume da mancha, podendo chegar de 75 a 100% de redução do volume para muitos refinados leves como gasolina e querosene (ITOPF, 2003), como especificados abaixo.

Tabela 1.3.4.1 Porcentagem de petróleo evaporado em função do tempo e da temperatura

Tempo em horas	Porcentagem evaporada em função da temperatura		
	20°C	21°C	38°C
5 h	16,5 %	19,5 %	23,5 %
10 h	19,5 %	22,5 %	27,0 %
20 h	21,5 %	25,0 %	30,0 %
30 h	23,0 %	27,0 %	32,0 %
40 h	24,0 %	28,0 %	33,0 %

Fonte: (PETROBRAS apud SILVA, 2004)

A toxicidade do produto também sofre influência desse processo. Os compostos mais leves são considerados mais tóxicos por serem mais biodisponíveis. No entanto, evaporam-se dentro das cinco primeiras horas. Desse modo, num derrame os compostos intermediários são os mais tóxicos, pois, apesar de também sofrerem evaporação, permanecem por mais tempo no ambiente. As propriedades do produto derramado e as condições ambientais, tais como: composição e volatilidade do produto; área e espessura da mancha (manchas menos espessas apresentam maior taxa de evaporação); radiação solar e temperatura da água (quanto maior a temperatura maior a taxa de evaporação); e ainda os ventos influenciam o processo de evaporação (CETESB, 2002).

O processo de dispersão que gera a formação de pequenas gotículas do óleo derramado, ficando suspensas na coluna d'água, facilita o processo de biodegradação. Este processo é dependente da mistura natural ou turbulências geradas pelo vento e ondas. Durante os primeiros dias do derrame, a dispersão constitui-se em um dos mais importantes processos de intemperização. Ela atinge seu máximo em aproximadamente dez horas e continua por muitas semanas participando da redução do volume da mancha, sem alterar as propriedades físicas e químicas do produto (ITOPF, 2003).

Fatores como viscosidade, coesão entre as moléculas e tensão interfacial, muito influencia o processo de dispersão, visto que quanto mais viscoso o óleo, quanto mais espessa a mancha e quanto maior a tensão interfacial entre o óleo e água, menor será sua dispersão.

A dissolução consiste na transferência dos compostos do produto derramado para a coluna d'água. Apenas uma pequena fração se dissolve, cerca de 2% a 5%. O processo de dissolução é improvável para alguns tipos de óleo, isto porque componentes que poderiam se dissolver, provavelmente, evapora-se primeiro, já que a evaporação ocorre 10 a 100

vezes mais rápida. E mesmo quando se dissolvem, podem ser removidos por subsequente evaporação ou por algum outro processo, como biodegradação ou foto-oxidação. As frações que se dissolvem são normalmente as mais tóxicas e, uma vez dissolvidas, tornam-se biodisponíveis. Compostos como os hidrocarbonetos aromáticos, são mais leves e, portanto mais solúveis (CETESB, 2002)

Outro processo de intemperização de extrema importância é o processo de emulsificação, que se caracteriza pela incorporação de água ao óleo formando um novo produto (emulsão óleo-água, conhecida como *mousse*) que é relativamente resistente a outros processos de intemperização. A emulsificação aumenta de duas a três vezes, o volume total de óleo remanescente no ambiente. A emulsão formada no processo contém de 30% a 80% de água, é extremamente viscosa e tem densidade próxima a da água do mar, formando como produto final de um derrame as conhecidas pelotas de óleo ou *tar balls* (SILVA, 2004).

O início do processo ocorre ainda no primeiro dia e pode persistir ao longo do primeiro ano, mas grande parte da emulsão é formada ainda durante a primeira semana após a perda dos componentes leves, principalmente pelos processos de evaporação e dissolução. O processo depende diretamente da viscosidade e composição do óleo, além do estado do mar. Óleos mais viscosos com componentes pesados (altos teores de asfaltenos e parafinas) tendem a formar emulsões água-óleo estáveis. E quanto maior a energia de mistura, mais rapidamente forma-se uma emulsão.

A sedimentação pode ocorrer essencialmente de três formas: adesão a partículas em suspensão, deposição como pelotas fecais ou por afundamento direto, resultante do aumento da densidade em consequência da intemperização. Seu início ocorre logo após o derrame, atingindo o pico algumas semanas depois. É um processo importante em áreas costeiras com alto hidrodinamismo onde há maior quantidade de organismos e partículas em suspensão na coluna d'água (CETESB, 2004). Normalmente, o processo ocorre com os componentes pesados que não se dissolvem na água. A densidade específica influencia o processo de forma que quanto maior a densidade específica, menos partículas em suspensão são necessárias para que o óleo se sedimente. E ressalva-se ainda que, o óleo uma vez sedimentado, torna-se uma fonte de contaminação a longo prazo, devido a sua residência no ambiente.

O processo através do qual microrganismos (bactérias e fungos) presentes no meio se utilizam dos hidrocarbonetos de petróleo como fonte de alimentação, transformando as moléculas em subprodutos oxidados que serão, por fim, degradados a CO<sub>2</sub> e água, chama-se de biodegradação. É um processo significativo, porém lento, que se inicia tão logo ocorra

detoxificação do óleo derramado pelos processos de intemperização e a população microbiana residente tenha crescido e se multiplicado. O pico normalmente ocorre dentro do primeiro mês, na superfície e coluna d'água, no sedimento e na costa. A disponibilidade de nutrientes e oxigênio são fatores limitantes do processo. A atividade microbiana é influenciada pela temperatura, sendo este um fator que também causa interferência no processo (CETESB, 2002).

Dentre os processos de intemperização sofridos pelos hidrocarbonetos do petróleo há também a foto-oxidação que acontece quando componentes do óleo são quimicamente transformados através de uma reação foto-química, na presença de oxigênio, para produzir novos compostos que tendem a ser mais solúveis e tóxicos. Tais produtos, no entanto, apresentam meia-vida que variam de poucas horas a poucos dias porque são degradados por outras ações fotolíticas e estão sujeitos a se diluírem na coluna d'água. A ação da foto-oxidação depende diretamente de irradiação solar, não tem grande significância na intemperização do óleo como um todo (ITOPF, 2003), é iniciado dentro de algumas horas após o derrame e pode durar de semanas a meses.

### **1.3.5 Conseqüências dos derramamentos de hidrocarbonetos**

Os efeitos no meio ambiente decorrentes de derrames de petróleo e de derivados podem ser classificados como agudos ou crônicos. Impactos agudos são aqueles que causam efeitos letais aos organismos, geralmente decorrentes de um evento acidental que os expõe ao agente contaminante por um curto período de tempo, sendo as frações tóxicas solúveis em água rapidamente diluídas, procedendo à recuperação da área atingida a partir do recrutamento de organismos oriundos de regiões não atingidas. Caracteriza-se poluição crônica como a exposição prolongada ao agente contaminante; fazendo com que as frações tóxicas persistam no ambiente, dificultando ou mesmo inviabilizando a recuperação do mesmo. Os impactos crônicos geram efeitos sub-letais que podem afetar algum estágio do ciclo de vida do organismo como o crescimento, a reprodução e o desenvolvimento larval. Esses impactos decorrem de atividades desenvolvidas ao longo dos anos, sendo esse tipo de poluição considerada ecologicamente mais grave do que a aguda (SILVA, 2004).

Relacionando as atividades petrolíferas com a poluição marinha por hidrocarbonetos de petróleo, a contaminação ocorre de forma crônica, como resultado de uma ação rotineira

de manutenção dos navios e constantes descargas nos portos e terminais, e de forma aguda como resultado de eventuais derrames no meio ambiente em função de acidentes com petroleiros.

Um derrame pode provocar uma série de impactos, dentre eles alterações físicas e químicas dos *habitats* naturais, resultante, por exemplo, da incorporação do óleo ao sedimento, recobrimento físico da fauna e flora, efeitos letais ou sub-letais nos organismos e mudanças nas comunidades biológicas resultantes dos efeitos do óleo sobre organismos-chave. Esses efeitos podem ser divididos em visíveis e não-visíveis. Os efeitos visíveis podem ser caracterizados pela morte de organismos (aves, mamíferos marinhos, peixes, etc), o gosto de óleo nos recursos pesqueiros e sujeira nas praias, redes de pesca e embarcações, enquanto que os efeitos não visíveis representam interferências nos diversos níveis de organização de um sistema, desde as funções celulares e fisiológicas até a estrutura ecológica das comunidades aquáticas (KHANNA; BARUA, 2001)

Outras conseqüências em se tratando de efeitos em curto prazo podem ser causadas por recobrimento e asfixia, tais como redução da luminosidade, diminuição do oxigênio dissolvido, danos às aves aquáticas e pela toxicidade do produto derramado. Já os efeitos em longo prazo não são tão aparentes, além do que alguns compostos podem ser bioacumulados ao longo da cadeia trófica podendo trazer efeitos nocivos ao homem.

Efeitos sub-letais relacionados com a toxicidade dos hidrocarbonetos repercutem na capacidade de reprodução, crescimento e alimentação, tendo estes sido observados experimentalmente.

A extensão dos impactos causados pelo derramamento de petróleo no ambiente está diretamente relacionada à quantidade e tipo de óleo derramado, às características do ambiente atingido e sua sensibilidade, às condições meteo-oceanográficas e ao tempo de permanência do petróleo no meio ambiente (POFFO, 2000). Mesmo que em pequeno porte, um derrame pode levar a danos irreversíveis, e quando ocorrido nas proximidades costeiras, esses danos são ainda maiores,

O sedimento que se torna uma fonte de hidrocarbonetos para a coluna d'água gerando conseqüências, tais como a redução da disponibilidade de oxigênio restringindo a degradação bacteriana e a conseqüente recuperação ambiental, também se mostra um bom indicador da magnitude da contaminação no ambiente marinho, uma vez que as partículas de sedimento adsorvem os poluentes da coluna d'água e os acumula, elevando-os a níveis detectáveis (KINGSTON et al., 2003). O óleo no sedimento, mesmo em concentrações relativamente baixas, pode alterar a estrutura das comunidades bentônicas, seja através de uma poluição aguda ou crônica. As espécies sensíveis morrem ou abandonam o local e são

substituídas por espécies oportunistas tolerantes ao óleo. O número total de espécies diminui e, geralmente, a biomassa também diminui.

Em geral, os organismos bentônicos da região entre marés de ambientes expostos aos derramamentos se recuperam mais rapidamente visto que os organismos dessas áreas tendem a ser mais efêmeros e, conseqüentemente, mais aptos a recolonizar um ambiente impactado.

Os efeitos biológicos dos hidrocarbonetos de petróleo sobre os organismos marinhos dependem de sua persistência e biodisponibilidade, da capacidade dos organismos de acumular e metabolizar diversos hidrocarbonetos, do destino dos produtos metabolizados e da interferência dos hidrocarbonetos sobre os processos metabólicos normais que podem alterar as chances de sobrevivência e reprodução de um organismo no meio ambiente. Considerando os efeitos de longo prazo, é importante citar as mudanças ecológicas na estrutura e função da comunidade e os impactos nos recursos pesqueiros.

Os impactos sobre os organismos podem ser físicos quando os mesmos são recobertos pelo produto derramado, podendo levar à morte dos mesmos por asfixia, e/ou tóxicos quando acumulam hidrocarbonetos depositados no sedimento. Efeitos tóxicos podem dizimar culturas inteiras de recursos pesqueiros (CRAPEZ, 2001). Ao atingir o ambiente marinho, o óleo afeta primeiramente a coluna d'água, expondo os organismos pelágicos imediatamente ao produto derramado. Há claras evidências de que o óleo dissolvido pode causar prejuízos aos organismos e à comunidade planctônica, se persistir em concentrações suficientemente altas por um período de tempo. No entanto, o sistema planctônico é caracterizado por grandes variações naturais, espacial e temporal, fazendo com que seja extremamente difícil a determinação dos efeitos da poluição por óleo. Embora para as comunidades do infralitoral, a recuperação já é um pouco mais demorada uma vez que este ambiente normalmente é contaminado pelo óleo que sedimenta e não há práticas de limpeza para a remoção do óleo (KINGSTON, 2002).

Outros organismos que sofrem conseqüências em decorrência de derramamentos são os filtradores, pois acumulam hidrocarbonetos em níveis superiores ao do ambiente. No entanto, tão logo sejam expostos a uma água limpa, os contaminantes são rapidamente depurados.

As aves, embora vivam num outro habitat, também são organismos afetados direta ou indiretamente pelos derramamentos. Os efeitos diretos sub-letais da contaminação prejudicam o desempenho (reprodutivo, alimentar) dos indivíduos e os efeitos indiretos às aves são decorrentes das alterações nos ecossistemas, como por exemplo, a redução da oferta de alimento.

A tabela abaixo faz uma síntese e elucida bem os efeitos dos derramamentos sobre comunidades biológicas.

Tabela 1.3.5.1 Efeitos do derrame de petróleo em comunidades biológicas

Comunidade		Efeito
<b>Bactérias</b>		Positivos para os grupos que degradam o óleo, com expressivo aumento das populações, e negativos para os grupos que não têm afinidade com o mesmo.
<b>Plâncton</b>	Biomassa e produtividade do fitoplâncton	Aumento devido à diminuição da pastagem; depressão da clorofila a.
	Zooplâncton	Redução da população; contaminação.
<b>Bentos</b>	Anfípodas, isópodas, ostracodas	Mortalidade inicial; população decresce
	Moluscos, especialmente bivalves	Mortalidade inicial; contaminação, histopatologia
	Poliquetas oportunistas	População aumenta
	Comunidades dos macrobentos	Decréscimo de diversidade
<b>Entre marés e litoral</b>	Crustáceos e carangueijos	Mortalidade inicial; população decresce.
	Moluscos	Mortalidade inicial; contaminação, histopatologia
	Poliquetas oportunistas	População aumenta
	Maioria das comunidades	Decréscimo de diversidade
<b>Algas</b>		Decréscimo de biomassa; espécies são substituídas
<b>Peixes</b>	Ovos e larvas	Diminuição de eclosão e sobrevivência
	Adultos	Mortalidade inicial; contaminação, histopatologia. Normalmente afastam-se do local atingido.
<b>Aves</b>	Adultos	Mortalidade por esgotamento físico (recobrimento), intoxicação; decréscimo populacional

Fonte: CRAPEZ, 2001

A região costeira apresenta grande riqueza biológica, abrigando boa parte da biodiversidade marinha. A costa brasileira, com 7.491 km de extensão, abriga inúmeros ecossistemas típicos: manguezais, costões rochosos, praias, recifes de coral, marismas e águas abertas. Muitos desses ecossistemas costeiros tornam-se mais vulneráveis quando têm em suas proximidades terminais marítimos, onde ocorrem as atividades de carga e descarga dos navios (CETESB, 2004).

Nos ecossistemas de manguezais os derrames de óleo podem gerar um efeito tóxico sobre as raízes e sobre os organismos deste habitat. Pode também ocorrer, uma redução a decomposição microbiana, além de recobrimento da fauna e da zona de trocas gasosas dos vegetais. Nos marismas, ocorre absorção da fração tóxica do óleo através de folhas ou raízes podendo causar envenenamento pela ruptura das membranas e organelas celulares. Nas praias e costões rochosos, o impacto varia em função do hidrodinamismo, ocasionando recobrimento, intoxicação dos organismos, e provocando assim interferência nos processos de locomoção, alimentação e reprodução. Em se tratando dos recifes de coral, óleos leves representam mais perigo por conterem maior quantidade de frações tóxicas solúveis, além do que óleos pesados dificilmente entram em contato com os recifes. Em águas abertas os efeitos advindos podem ser sub-letais ou ainda letais. Além do mais, todos estes ecossistemas podem sofrer impactos bioacumulativos provenientes de um derrame, podendo ainda levar a morte dos organismos que habitam a localidade acidentada. (SILVA, 2004).

### **1.3.6 Medidas preventivas para derramamentos de hidrocarbonetos no mar**

Em 1954, a IMO (*International Maritime Organization* - agência especializada da ONU para assuntos marítimos) já aprovava sua primeira Convenção Internacional para a Prevenção da Poluição por Óleo – OILPOL, posteriormente MARPOL. Desde então, outras convenções foram aprovadas (ARAÚJO, 2002). Mediante a gravidade da situação, a IMO com o intuito de prevenir a poluição acidental e operacional, preconizou ações que culminaram em acordos internacionais, destacando-se a Convenção Internacional para a Prevenção da Poluição por Navios – MARPOL 1973, que ficou posteriormente conhecida como MARPOL 73/78 após inclusão em 1978 de alterações no texto original (IMO, 2003a).

Por volta de 1992, a MARPOL introduziu a exigência do casco duplo para navios de 5.000 tpb ou maior, ordenados a partir de 1993, e um cronograma para conversão ou desativação de navios de casco simples a partir de 1995 (SILVA, 2004).

De acordo com Barrow e Rothschild (2002), a legislação ambiental em diversas partes do mundo surge em resposta a um desastre ambiental, sendo caracterizada como “legislação emergencial”. E no Brasil não é diferente, podendo ser citada como exemplo a criação da Lei nº 9.966 do ano de 2000 (Lei do óleo), após o acidente ocorrido na baía de Guanabara no mesmo ano, e em seguida a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 237, do ano de 2001 (diretrizes para elaboração dos Planos de Emergência Individuais – PEIs).

Mas apesar de tantos cuidados e leis estabelecidas ao longo de décadas, enquanto se falar da existência do petróleo e de desenvolvimento sustentável, os transportes marítimos com cargas petrolíferas continuarão existindo e junto com eles o risco potencial de acidentes envolvendo derramamentos de petróleo e derivados. E é justamente por esta questão, que técnicas de limpeza são estudadas com tanta ênfase por pesquisadores, principalmente os envolvidos com a pesquisa ambiental.

### **1.3.7 Processos de remediação**

Existem duas classes distintas de remediação: *in situ* ou *on-site* e *ex-situ* ou *off-site*. As remediações *in-situ* são frequentemente preferidas porque são mais baratas. Por outro lado, transportar água e ou solo contaminados para um local remoto antes de limpá-los, muitas vezes pode ser mais complicado. A remediação *ex-situ* tem a vantagem adicional de extrair a maior parte dos contaminantes para fora do local antes que eles se espalhem ainda mais.

Em geral, tecnologias de reabilitação podem ser agrupadas em categorias usando técnicas físico-químicas ou métodos biológicos. As diferentes técnicas geralmente funcionam bem quando aplicadas a um tipo específico de poluição.

#### **1.3.7.1 Remediação físico-química**

Processos físico-químicos têm sido largamente empregados na remediação de águas contaminadas, normalmente mostrando compatibilidade com os critérios ambientais estabelecidos pelas legislações vigentes. Alguns processos são expostos na tabela abaixo.

Tabela 1.3.7.1.1 Tecnologias de tratamentos por processos físico-químicos.

<b>Tecnologia</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Processo</b>
<i>Pump-and-treat</i>	<i>ex situ</i>	Físico-químico
<i>Air stripping</i>	<i>in situ</i>	Físico
Lavagem do solo	<i>in situ</i>	Físico
	<i>ex situ</i>	
Extração por vapor	<i>in situ</i>	Físico
Estabilização	<i>in situ</i>	Físico-químico
Solidificação	<i>ex situ</i>	
Barreiras reativas	<i>in situ</i>	Físico-químico

Fonte: MEIRA, 2007

No caso de águas contaminadas, a tecnologia de tratamento mais utilizada corresponde ao sistema *pump-and-treat*, que consiste na remoção da água contaminada por bombeamento, seguida de tratamento "*ex situ*" por processos convencionais, geralmente adsorção em carvão ativado (MACKAY et al., 2000). Apesar de este processo ser eficiente, ele apresenta sérias limitações, principalmente relacionadas com o seu caráter não destrutivo, ou seja, esta técnica simplesmente leva à geração de fases sólidas saturadas com poluentes não destruídos. Adicionalmente, a necessidade de associar diversas tecnologias de tratamento faz com que os processos se tornem demorados e dispendiosos, principalmente pela complexidade das instalações (MEIRA, 2007).

A biorremediação muitas vezes aparece como uma ferramenta viável na restauração ambiental da superfície contaminada, principalmente quando a área contaminada possui grande extensão e volume, o que inviabiliza a escavação e outras tecnologias, permitindo a remediação "*in situ*", ou seja, no próprio local. (FANG; BARCELONA, 2003).

### 1.3.7.2 Biorremediação

A biorremediação caracteriza-se como uma tecnologia limpa e de baixo custo, que permite a recuperação de locais contaminados pela estimulação do crescimento de microrganismos que possuem capacidade de degradar o óleo, convertendo substâncias complexas em moléculas mais simples ou voláteis, promovendo a degradação de contaminantes (CAMMAROTA; FREIRE, 2006).

A bioestimulação de populações de microrganismos autóctones com o objetivo de aumentar as taxas de biodegradação é frequentemente empregada em projetos de biorremediação (ATLAS, 1997). Para se utilizar o processo de bioestimulação, deve-se demonstrar que existe no local contaminado uma população natural de microrganismos capazes de biodegradar os contaminantes presentes e que as condições ambientais são insuficientes para se obter altas taxas de atividade microbiológica dessa população. Medidas das propriedades físicas e químicas de amostras do local podem revelar as limitações físico-químicas para a atividade microbiológica, a qual pode então ser modelada para indicar os fatores críticos limitantes (RAMASWAMI; LUTHY, 1997). Algumas limitações naturais comuns à biodegradação de poluentes são: altos níveis de concentração de poluentes, falta de oxigênio, pH desfavorável, falta de nutrientes minerais, baixa umidade e temperaturas desfavoráveis. Uma variedade de métodos que modificam as condições ambientais podem ser utilizados para melhorar as taxas das atividades biodegradadoras da população microbiológica autóctone. Uma vez que as condições naturais limitantes são corrigidas, a distribuição natural existente de microrganismos permite, em muitos casos, um enriquecimento espontâneo dos microrganismos apropriados à degradação.

A introdução de microrganismos não indígenos (alóctones) ou introduzidas no ambiente através de ação antropogênica, pode ser considerada em locais, onde após a contagem das bactérias heterotróficas totais e fungos, foi identificada uma insuficiência de microrganismos indígenos, para a biodegradação do resíduo em questão, mesmo após a tentativa da bioestimulação (SPILBORGHS, 1997). O bioaumento é um processo de biorremediação que utiliza microrganismos alóctones muitas vezes encontrados em produtos biotecnológicos comercializados. Esse processo é necessário quando um local contaminado não possui ou possui em quantidades insuficientes, os requisitos necessários para que o processo de degradação ocorra. Assim, essa técnica tem como objetivo acelerar ou estimular a biodegradação através do aumento do crescimento microbiano tanto quanto, pela otimização do ambiente em questão (GENTRY et al., 2004; MARIANO, 2006).

A biodegradação ou biotransformação de compostos orgânicos contaminantes é uma das principais medidas de recuperação de ecossistemas contaminados e requer a interação de muitos grupos de organismos vivos diferentes que trabalhem juntos ou seqüencialmente na degradação dos compostos (KATAOKA, 2001).

Os mais eficientes biodegradadores são os microrganismos devido à abundância, grande diversidade de espécies, versatilidade catabólica e anabólica, bem como a capacidade de adaptação às condições adversas do meio. Muitos trabalhos envolvendo a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo têm sido desenvolvidos utilizando consórcio

de microrganismos (JORGENSEN et al., 2000; LI et al., 2000; DEL' ARCO; FRANÇA, 2001; MISHRA et al., 2001; VASUDEVAN; RAJARAM, 2001).

Em uma cultura mista, o produto metabólico pode ser degradado por uma só espécie, sendo que o ataque de outros microrganismos leva a uma completa degradação do produto, mesmo que dentro da comunidade não exista um microrganismo capaz de degradá-lo totalmente (KATAOKA, 2001). Condições aeróbicas e microrganismos adequados são fatores importantes na biorremediação de solos e águas contaminados por resíduos de petróleo. Baixa concentração de oxigênio pode influenciar a mineralização dos hidrocarbonetos por microrganismos (VASUDEVA; RAJARAM, 2001). No caso de solos, é necessário que se faça o revolvimento periodicamente para promover a aeração da camada fértil e propiciar o contato da matéria orgânica a ser degradada com os microrganismos existentes no solo, procurando assim acelerar o processo de biodegradação (KATAOKA, 2001).

O processo de biodegradação do petróleo por bactérias e fungos, envolve todos os fenômenos de quebra de seus constituintes em componentes de menor peso molecular. A biodegradação completa dos hidrocarbonetos tem como produtos finais o dióxido de carbono e a água. A biodegradação do petróleo por populações naturais de microrganismos representa um dos mecanismos primários de eliminação de compostos poluentes do meio ambiente. Alguns compostos do petróleo são evaporados ou biodegradados, enquanto outros persistem recalcitrantes na natureza. Existem algumas revisões que tratam da degradação de hidrocarbonetos por microrganismos que incluem os principais tipos de microrganismos, as vias metabólicas e os efeitos da contaminação em comunidades microbianas (ATLAS, 1997, 1981, 1984; COLWELL; WALKER 1977; LEAHY; COLWELL, 1990; BAIRD, 2002, BENTO, 2005).

Apesar das bactérias serem provavelmente as maiores responsáveis pela biodegradação de hidrocarbonetos no ambiente, os fungos e as leveduras (CERNIGLIA et al., 1977; MacGILLIVARY; SHIARIS, 1993), as cianobactérias, as algas e mesmo os protozoários apresentam capacidade de degradação (CERNIGLIA et al., 1979). Como a degradação de hidrocarbonetos para CO<sub>2</sub> envolve uma reação de oxidação, os organismos, em sua maioria, aeróbios são responsáveis por esse metabolismo. O destino dos hidrocarbonetos, além da produção de CO<sub>2</sub> na degradação total, pode também oferecer caminhos alternativos. Eles podem ser armazenados como glóbulos e alguns podem ser incorporados como biomassa (BERTRAND et al., 1983; DUMENIL et al., 1988), porém os produtos parcialmente oxidados podem ser mais tóxicos e mutagênicos que o hidrocarboneto original (WANG et al., 1990).

Rosenberg et al. (1984) demonstraram a necessidade de interação física direta entre células microbianas e substratos óleo-hidrofóbicos para o início da biodegradação. Vários investigadores (RATLEDGE, 1980; REDDY et al., 1982) consideraram importante a exigência de processo de internalização seguido por degradação através de enzimas intra ou extra-celulares. O processo de internalização é mediado por biosurfactantes e bioemulsificantes. A internalização de hidrocarbonetos ocorre através de formação de microemulsão, presumivelmente diminuindo a tensão interfacial (REDDY et al., 1982). Embora, a literatura a respeito dos efeitos de surfactantes sobre a capacidade de utilização de hidrocarbonetos apresente diferentes resultados, a maioria dos artigos indica o seu importante papel na dispersão e degradação efetivas de óleos poluentes no ambiente marinho (ARONSTEIN et al., 1991; OBERBREMER et al., 1990; LAHA; LUTHY, 1992; VOLKERING et al., 1993).

Processos bioquímicos de degradação de petróleo com participação de microrganismos incluem vários tipos de reações enzimáticas baseadas em processos de oxidação-redução (oxidases ou desidrogenases) e ou em reações por ação de hidrolases. As enzimas causam hidroxilação de aromáticos e alifáticos, desaminação oxidativa, hidrólise e outras transformações bioquímicas das substâncias do petróleo original e dos produtos intermediários da sua degradação (PATIN, 1999). Há linhagens de microrganismos capazes de degradar compostos com cinco ou mais anéis aromáticos. Geralmente, a oxidação dos hidrocarbonetos aromáticos se processa produzindo principalmente fenóis (BENTO, 2005).

Os microrganismos necessitam de condições ambientais de crescimento, nas quais a velocidade e a extensão com que degradam os componentes do petróleo dependem da umidade (facilita as reações), quantidade de oxigênio, da presença de nutrientes e do contato do óleo com a água (BAIRD, 2002):

Por outro lado, a biodegradação de hidrocarbonetos depende ainda de seu estado de dispersão e é geralmente maximizada quando o substrato insolúvel em água é dissolvido, solubilizado ou emulsificado (MATTEI et al., 1986; HARAYAMA et al., 1999). Surfactantes sintéticos e de origem microbiológica ou biosurfactantes são freqüentemente usados para limpar derramamentos de petróleo e seus derivados no meio ambiente.

### **1.3.8 Surfactantes**

Os surfactantes, também chamados de tensoativos, emulsificantes ou agentes de interface, são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção

hidrofílica. A porção apolar é freqüentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica. Geralmente, os surfactantes são utilizados em produtos comerciais com a finalidade de melhorar a dispersão (ou a solubilização) de materiais hidrofóbicos em água (MULLIGHAN; GIBBS, 1993). Com este propósito, a eficácia destes compostos é avaliada em função de algumas propriedades físicas deles próprios e das misturas que estabelecem com a água, como solubilidade, concentração micelar crítica (CMC), tensão superficial e tensão interfacial.

Em uma emulsão, onde existe um limite interfacial entre duas fases imiscíveis, os surfactantes concentram-se nas interfaces, sólido-líquido, líquido-líquido ou vapor-líquido. A parte hidrofóbica da molécula concentra-se na superfície voltada à fase oleosa, enquanto a porção hidrofílica está orientada para a fase aquosa (MULLIGHAN, 2005). A tensão superficial, que é uma medida da energia livre da superfície por unidade de área requerida para trazer uma molécula à superfície (ROSEN, 1978 apud MULLIGHAN, 2005), correlaciona-se com a concentração do composto ativo na superfície até que a CMC seja alcançada. Assim, a CMC é definida como a concentração máxima necessária para o início da formação da micela (BECHER, 1965 apud MULLIGHAN, 2005). A tensão interfacial (ASTM D971 e D-2285) de um óleo é a força necessária para romper o filme de óleo existente em uma interface óleo/água, sendo variável com a presença de contaminantes. Ao contrário da tensão superficial de um líquido, a tensão interfacial de um par de substâncias pode ser negativa; neste caso a energia potencial de coesão diminui à medida que a área da interface aumenta, e este aumento se produz espontaneamente por ser a adesão entre as moléculas mais intensa do que a coesão entre elas (SOUZA, 1995).

A eficácia de um surfactante é determinada por sua habilidade de diminuir a tensão superficial da água, pois o surfactante interage com a molécula de água e diminui o trabalho requerido para trazer uma molécula à superfície e assim, a tensão superficial é reduzida. Um surfactante eficaz pode diminuir a tensão superficial da água de 72 a 35 mN/m e a tensão interfacial (TI) de n-hexadecano em água de 40 a 1 mN/m. Na prática, a CMC é também a concentração mínima de monômeros de surfactante na água e é influenciada pelo pH, pela temperatura e pela força iônica. Os surfactantes eficientes apresentam uma CMC baixa, pois a concentração de surfactante necessária para reduzir da tensão superficial ao mínimo é menor (OBERBREMER et al., 1990; SAMSON et al., 1990).

Uma outra característica importante dos surfactantes é o balanço hidrofílico-lipofílico (BHL) que é conferido pela composição da mistura. BHL é uma expressão numérica relativa da atração simultânea do emulsificante pela água e pelo óleo cujo valor informa a solubilidade do emulsificante em óleo ou água. Em geral, as moléculas com baixo BHL são

lipofílicas, enquanto as de BHL alto são mais solúveis em água (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002). A Tabela 1.3.8.1.1 ilustra as aplicações de tensoativos não-iônicos com diferentes valores de BHL e seus usos.

Tabela 1.3.8.1.1 Aplicações para tensoativos não-iônicos em relação aos valores de BHL (balanço hidrofílico-lipofílico)

BHL	Usos
< 3	Filmes de superfície
3 – 6	Emulsificantes água em óleo (a/o)
7 – 9	Espalhamento de líquidos em superfícies sólidas
8 -15	Emulsificantes óleo em água (o/a)
13 -15	Detergentes
15 -18	Solubilidade

Fonte: CHRISTOFI; IVSHINA, 2002

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente levou à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes.

### 1.3.8.1 Biossurfactantes

Os biossurfactantes são produzidos principalmente por microrganismos aeróbicos a partir de uma fonte de carbono. Uma variedade de microrganismos produz potentes agentes de superfície ativa, os biossurfactantes, os quais variam nas propriedades químicas e no tamanho molecular.

A capacidade do biossurfactante em emulsificar misturas de hidrocarboneto/água tem sido muito bem documentada. Esta propriedade é demonstrada pelo aumento significativo de degradação de hidrocarbonetos e por isso é utilizado nos processos de biorremediação (LOBATO, 2000; CRAPEZ et al., 2002). De acordo com Cameotra e Bollag (2003), os biossurfactantes podem ser utilizados "*in situ*" para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos e desta maneira, facilitam o acesso dos microrganismos naturalmente presentes no ambiente para que ocorra a degradação dos

compostos hidrofóbicos. E segundo Maier e Soberon-Chavez (2000), a sua eficácia depende das suas propriedades funcionais.

Os biossurfactantes constituem um grupo de diversas moléculas sintetizadas por vários gêneros microbianos (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004; NITSCHKE et al., 2005a). Esses compostos oferecem muitas vantagens em relação aos surfactantes de origem química, tais como: aceitabilidade ecológica, pois são potencialmente aplicáveis em proteção ambiental (RAHMAN et al., 2002); baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (COSTA et al., 2006; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; RAHMAN et al., 2002); efetividade em ampla faixa de temperatura e pH e salinidade (BANAT et al., 2000; KOSARIC, 2001; MULLIGHAN, 2005); produção a partir de fontes renováveis (NITSCHKE et al., 2005b; BENINCASA et al., 2002) e maior eficiência em relação aos surfactantes sintéticos.

A grande desvantagem dos biossurfactantes é seu custo de produção que é cerca de 3 a 10 vezes maior do que o custo dos surfactantes sintéticos (MULLIGHAN; GIBBS, 1993). Conseqüentemente, o futuro das aplicações dos biossurfactantes será governado principalmente pelo ganho econômico na produção versus o custo da aplicação.

Enquanto surfactantes químicos são classificados de acordo com a natureza de seu grupo polar, os biossurfactantes são classificados com base em sua natureza bioquímica, e também a partir de sua baixa e alta massa molar. Na tabela 1.3.9.1 são apresentadas as principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores.

Cada grupo de biossurfactantes apresenta propriedades e funções fisiológicas diferentes, sendo que a maioria é constituída por porções hidrofílicas e hidrofóbicas distintas. A parte hidrofóbica da molécula pode ser formada por ácidos graxos de cadeia longa, hidróxi-ácidos graxos ou por  $\alpha$ -alquil- $\beta$ -hidróxi-ácidos graxos. A porção hidrofílica pode ser composta por carboidratos, aminoácidos, peptídeos cíclicos, fosfato, ácidos carboxílicos ou álcoois (JACOBUCCI, 2000).

Uma grande variedade de microrganismos pode produzir biossurfactantes. Assim como a sua composição pode variar, as propriedades físico-químicas dos biossurfactantes também são bastante variáveis: os valores de CMC podem estar situados numa faixa de 1 a 200 mg/L, enquanto para surfactantes sintéticos a CMC apresenta valores em uma faixa bem mais elevada podendo chegar a valores como de 2420 mg/L para o SDS (dodecilsulfato de sódio) um surfactante sintético bem conhecido, e suas massas molares situam-se entre 500 a 1500 Da (VAN HAMME et al., 2006).

Tabela 1.3.8.1.2 Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores

<b>Tipo de biossurfactante</b>	<b>Microrganismo produtor</b>
<b>GLICOLÍDEOS</b>	
- ramnolipídeos - soforolipídeos - trealolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apícola</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
<b>LIPOPEPTÍDEOS E LIPOPROTEÍNAS</b>	
- peptídeo-lipídeo - viscosina - serrawetina - surfactina - subtilisina - gramicidina - polimixina	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus polymyxa</i>
<b>ÁCIDOS GRAXOS, LIPÍDEOS NEUTROS E FOSFOLIPÍDEOS</b>	
- ácidos graxos - lipídeos neutros - fosfolipídeos	<i>Corynebacterium lepus</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
<b>SURFACTANTES POLIMÉRICOS</b>	
- emulsan - biodispersan - liposan - carboidrato-lipídeo-proteína - manana-lipídeo-proteína	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Candida tropicalis</i>
<b>SURFACTANTES PARTICULADOS</b>	
- vesículas - células	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Várias bactérias

Fonte: NITSCHKE et al., 2002

### 1.3.9 Produção de bioemulsificantes/biossurfactantes em meios à base de água do mar por *Candida lipolytica*

A *Candida lipolytica* (Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Classe *Saccharomycetes*, Ordem *Saccharomycetales*, Família *Saccharomycetaceae*, Gênero *Candida*) é uma espécie

de levedura de grande interesse para a biotecnologia, principalmente devido ao seu conhecido potencial na produção de biossurfactantes. Estudos fisiológicos com leveduras marinhas têm posto em evidência a ampla margem de adaptabilidade de algumas delas. Por exemplo, ao estudar o efeito da pressão osmótica se encontram diferentes respostas para organismos dos gêneros *Aurobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces* e *Rhodotorula* (Hernández-Saavedra et al., 1994; 1995). Duas estratégias gerais dos microrganismos para sobreviver em ambientes de alta salinidade têm sido observadas: (i) exclusão de sódio do citoplasma, acumulando grandes quantidades de soluto compatíveis para evitar a perda de água (sólidos-excludentes); (ii) uso e armazenamento pelos microrganismos de altas concentrações de sódio, sem que este represente um problema de toxicidade para a célula (sólido-includentes). As leveduras têm sido um modelo amplamente utilizado para entender o fenômeno da halotolerância. *Saccharomyces cerevisiae* que é uma levedura sódio-excludente. A levedura *D. hansenii* apresenta a capacidade de resistir a altas concentrações de NaCl, pode ser isolada de ambientes com baixa atividade de água ou de ambientes marinhos, sendo considerada como um modelo eucariótico ideal para estudos de halotolerância.

A água do mar usada na formulação de meios de cultivos para desenvolvimento de leveduras marinhas favorece seu crescimento de forma seletiva e reduz riscos de contaminação. Alguns microrganismos não resistem à concentração de metais e sais presentes na água do mar. Outra vantagem do uso de água do mar na formulação dos meios de cultivo, é que proporciona minerais e nutrientes que complementados com baixas concentrações de extrato de levedura e peptona permite rendimentos que se equiparam aos de processos industriais (RAMÍREZ-OROZCO et al., 1998), fornecendo assim condições de trabalho que eventualmente transformam-se em oportunidades econômicas (OCHOA; VASQUEZ-JUAREZ, 2004).

A introdução e utilização de meios de baixo custo à base de água do mar, suplementados com óleo de milho para a produção de biopolímeros extracelulares, com atividade de emulsificação por *C. lipolytica*, foi descrita pela primeira vez por Vance-Harrop et al. (1999) e Vance-Harrop (2000). Dois meios de baixo custo, suplementados com óleo de milho, foram formulados e avaliados visando o estudo das condições de produção de biossurfactante por *C. lipolytica*. O meio denominado de YWS-C (*Yeast Salt Watter-Corn*) foi formulado com a seguinte composição: 0,1% de sulfato de amônio; 0,1% de uréia; 5% de óleo de milho; 100 mL de água do mar e água destilada, na proporção 1:1 v/v. O meio denominado YWS-C1 (*Yeast Salt Watter-Corn* 1) foi formulado com a mesma composição do meio YWS-C, acrescido de 10 mM de fosfato de potássio e pH ajustado para 5,3.

Controles foram realizados com os dois meios, utilizando-se D-glicose como fonte de carbono. Os resultados indicaram que o meio de cultura YWS-C1, utilizado como base nutriente, suplementado com óleo de milho ou D-glicose como controle, possibilitou a produção de biossurfactante com atividade de emulsificação, quando o pH era controlado através de tampão fosfato. A atividade de emulsificação foi observada no meio YWS-C1, na fermentação em batelada no período de 168 horas. Os resultados demonstraram que a *C. lipolytica* apresentou habilidade de crescimento nos meios com salinidade de 13% e os biopolímeros extracelularmente produzidos apresentaram alta atividade de emulsificação. Adicionalmente, a introdução de uréia como fonte de nitrogênio e de tampão fosfato induziu a produção de biossurfactante por *C. lipolytica* com propriedades de emulsificação.

Os resultados obtidos por Vance-Harrop et al. (1999) são corroborados pelas informações de Reisfield, Rosenberg e Gutnick (1972) que observaram a absoluta dependência da fonte de nitrogênio e do tampão fosfato na produção de biossurfactante.

Estudos realizados por Vance-Harrop et al. (2000) sobre a influência da água do mar na produção de surfactante por *C. lipolytica* demonstraram a capacidade da levedura produzir biopolímeros com atividade de emulsificação após a fase estacionária de crescimento. A produção de biossurfactante realizada nos meios previamente descritos por Vance-Harrop et al. (1999), utilizando água do mar diluída e suplementada com óleo de babaçu e D-glicose como fontes de carbono, não foi afetada pela alta salinidade dos meios de cultura. Esses resultados são apoiados por Zinjarde et al. (2003) que obtiveram a produção de um emulsificante pelo estágio perfeito, *Yarrowia lipolytica*, em um meio contendo água do mar artificial e n-hexadecano como fonte de carbono, visando sua utilização na dispersão da poluição dos derramamentos de óleos em ecossistemas marinhos.

A capacidade de *C. lipolytica* produzir biossurfactantes extracelulares com atividade de emulsificação, através de fermentação utilizando óleo de babaçu e D-glicose como fontes de carbono foi investigada por Vance-Harrop et al. (2003). A água do mar diluída a 50% suplementada com uréia, sulfato de amônio e fosfato foi utilizada como meio basal. Os melhores resultados foram atingidos com os meios YSW-B2 (contendo uréia, sulfato de amônio e óleo de babaçu) e YSW-B3 (contendo uréia, sulfato de amônio, fosfato e óleo de babaçu), através de fermentação em batelada alimentada com 5% de óleo de babaçu. As velocidades específicas de crescimento foram de  $0,02 \text{ h}^{-1}$  e  $0,04 \text{ h}^{-1}$ ; tempos de geração de  $34,6 \text{ h}^{-1}$  e  $17,3 \text{ h}^{-1}$  e atividades de emulsificação iguais a 0,666 e 0,158 UAE, respectivamente. As moléculas dos novos bioemulsificantes demonstraram ser constituídas por carboidratos, proteínas e lipídeos.

O potencial biotecnológico de *C. lipolytica* na produção de biossurfactante com habilidade de emulsificação – utilizando meios de cultura de baixo custo à base de água do mar, adicionados de óleo de babaçu e glicose como controle da fonte de carbono – também foi investigado por Vance-Harrop (2004). Planejamento fatorial fracionário com dois níveis e cinco fatores foi realizado para investigar a influência de extrato de levedura, sulfato de amônio, uréia, fosfato de potássio e óleo de babaçu sobre a produção de biossurfactante. Os resultados obtidos sugeriram maior produção com os níveis utilizados de extrato de levedura, fosfato e uréia nos seus valores superiores, enquanto que o da amônia foi fixado em seu nível inferior. A fonte de carbono, óleo de babaçu, não exerceu efeito significativo sobre a produção de biossurfactante. Cinco condições de meios de culturas selecionados do planejamento foram utilizadas para realização de estudos com substratos mistos (solúvel e insolúvel) para os processos de remoção e biossorção de pireno (derivado de petróleo). Os resultados das análises por cromatografia líquida de alta eficiência demonstraram uma alta taxa de remoção de pireno nos meios I e IV com percentuais de 99,02% e 97,51%, respectivamente. Estudos subseqüentes com a biossorção de pireno foram realizados utilizando a biomassa de *C. lipolytica* imobilizada em álcool polivinil como matriz inerte. Os resultados obtidos sugeriram que a biomassa imobilizada de *C. lipolytica* apresentou grande potencial nos processos de biossorção do pireno tendo em vista o baixo custo, da produção e da imobilização da biomassa, aliado ao elevado percentual de remoção.

Um planejamento fatorial completo  $2^4$  foi realizado por Albuquerque et al. (2005) para investigar os efeitos e interações das concentrações de óleo de milho, uréia, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio sobre a atividade de emulsificação do biossurfactante produzido por *Candida lipolytica*, com. Os resultados indicaram que as concentrações de fosfato monobásico de potássio e de sulfato de amônio, em seus níveis mais altos, e a concentração de óleo de milho em seu nível mais baixo, foram significativas favorecendo ao aumento da atividade de emulsificação. O estudo também mostrou que a interação da uréia com o fosfato, exerceu um efeito positivo significativo sobre o aumento da atividade de emulsificação. As interações da uréia com a amônia e do óleo de milho com a amônia apresentaram efeitos negativos significativos, observados através da redução da atividade de emulsificação. A melhor atividade de emulsificação para emulsões água-em-n-hexadecano (3,727 UAE) foi obtida com um meio composto por 0,4 g de uréia, 1,1 g de sulfato de amônio, 2,04 g de fosfato de potássio, 50 mL de água destilada e 50 mL de água do mar usando óleo de milho como fonte de carbono.

Otimização estatística de componentes de meios de produção de bioemulsificantes por *Candida lipolytica* foi realizada por Albuquerque et al. (2006a) usando planejamento

fatorial e metodologia de superfície de resposta. Um modelo matemático para representar a atividade de emulsificação como função das concentrações de uréia, sulfato de potássio e fosfato de amônio foi proposto (ALBUQUERQUE et al., 2006a). O modelo não apresentou falta de ajuste e o coeficiente de determinação indicou que o modelo pode explicar 95,72% da variabilidade na atividade de emulsificação para emulsões água-em-n-hexadecano. De acordo com o modelo, as concentrações de uréia, sulfato de amônio e fosfato de potássio necessárias para atingir a atividade de emulsificação máxima (4,415 UAE) foram respectivamente 0,544 % (p/v), 2,131 % (p/v) e 2,628 % (p/v). A validação do modelo foi realizada sob as condições do meio otimizado. Os resultados mostraram que a atividade de emulsificação para emulsões água-em-n-hexadecano prevista pelo modelo foi similar àquela obtida experimentalmente (diferença inferior a 0,5%). A otimização aumentou a atividade de emulsificação (1,198 UAE) do processo padrão (VANCE-HARROP, 2000) de produção de bioemulsificante em 262,8% nas condições do ponto central do planejamento experimental e em 272% nas condições otimizadas do meio de produção. O bioemulsificante produzido por *Candida lipolytica*, mostrou ser estável e reduziu a tensão superficial da água para 32,75 mN/m.

Ampliação do processo de produção de biossurfactante por *C.lipolytica* UCP 988 da escala de frasco para escala de biorreator de 5 litros foi realizada por Albuquerque (2006). Planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> e metodologia de superfície de resposta foram utilizados para investigar a influência da temperatura e da velocidade de agitação sobre as atividades de emulsificação do biossurfactante frente ao hexadecano, ao óleo de milho e ao óleo de canola. Nos experimentos do planejamento empregou-se meio de baixo custo a base de água do mar diluída a 50% (v/v) otimizado por Albuquerque (2006). Verificou-se que o aumento de temperatura exerceu efeito negativo significativo apenas sobre as atividades de emulsificação para emulsões água-em-hexadecano e água-em-óleo de milho e que o aumento da velocidade de agitação produziu efeito positivo apenas sobre a atividade de emulsificação para água-em-óleo de canola. A atividade de emulsificação média para emulsões água-em-hexadecano - obtidas em biorreator, a 28° C, com de agitação de 150 rpm e 300 rpm - foi igual a 5,45 UAE, ou seja, 21,5% maior que a atividade de emulsificação média para emulsões água-em-hexadecano (4,435 UAE) obtidas em frascos, a 28°C e 150 rpm, com o meio otimizado. Nas mesmas condições, foram obtidas atividades de emulsificação médias para emulsões água-em-óleo de milho e água-em-óleo de canola de respectivamente 6,010 UAE e 5,212 UAE. Portanto, nas faixas de temperatura e agitação estudadas, para obter-se altas atividades de emulsificações para emulsões água-em-hexadecano, água-em-óleo de milho e água-em-óleo de canola, a melhor condição

operacional de temperatura e pressão foi 28°C e 300 rpm. Entretanto, as mais altas atividades de emulsificação para emulsões água-em-hexadecano e água-em-óleo de milho foram obtidas na temperatura de 28°C e agitação de 150 rpm.

*Software sensores* baseados em redes neurais para estimação e predição, em tempo real, da concentração da biomassa e da atividade de emulsificação do biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* UCP 988 foram desenvolvidos por Albuquerque et al. (2006b). O algoritmo empregado nos treinamentos foi o de retropropagação baseado em Levenberg-Marquardt, em conjunção com regularização bayesiana. Os conjuntos de treinamento e teste dos "softwares sensores" foram obtidos em experimentos de produção de biossurfactante realizados em biorreator de 5L, sob diferentes condições de temperatura e agitação, utilizando meio de baixo custo a base de água do mar natural diluída a 50% (v/v), otimizado (ALBUQUERQUE et al., 2006a). Os resultados obtidos mostraram que os *software sensores* projetados fornecem estimações e predições *on-line* da concentração de biomassa e da atividade de emulsificação dentro de um intervalo de  $\pm 5\%$  dos valores experimentais. Coeficientes de determinação superiores a 0,90 foram obtidos para concentração de biomassa e atividade de emulsificação, evidenciando a qualidade do ajuste dos valores estimados e preditos pelos *software sensores* neurais com os dados experimentais dos conjuntos de treinamento e teste.

Visando reduzir custos e melhorar o monitoramento do processo de produção de biossurfactante por *C. lipolytica* UCP 988, Albuquerque et al. (2008) desenvolveram um *software sensor* baseado em redes neurais artificiais multicamadas com alimentação progressiva (feedforward) para fazer estimativas *on-line* da concentração de biomassa. Entre os diversos protótipos de *software sensores* testados para fazer inferência *on-line* da concentração de biomassa o que apresentou melhores resultados, teve como entradas dados *on-line* de pH e oxigênio dissolvido e 4 neurônios na camada escondida. O treinamento, validação e teste dos *software sensores* foram realizados com dados de planejamento experimental  $2^2$  realizado por Albuquerque (2006) usando meio otimizado a base de água do mar natural diluída a 50% (v/v). O desempenho do *software sensor* selecionado também foi avaliado usando dados experimentais do processo. Os resultados indicaram uma capacidade preditiva muito boa do *software sensor*, que apresentou coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,972 e raiz do erro quadrático médio igual a 0,021 para concentração da biomassa.

Biossurfactantes produzidos por microrganismos marinhos, como *Y. lipolytica*, vêm despertando maior atenção, principalmente para a biorremediação de mar poluído por óleos crus (MANEERAT, 2005). A cepa *Y. lipolytica* NCIM 3589, uma espécie marinha tropical,

pode produzir emulsificante na presença de hidrocarbonetos ou petróleo cru. Supostamente, o mecanismo de assimilação de hidrocarboneto se realiza através da aderência da levedura as gotas de óleo, o que faz com que se produza um emulsificante, formado por lipídeo-carboidrato e proteína, associado com a parede celular durante a fase de crescimento. Já na fase estacionária, a levedura *Y. lipolytica* NCIM 3589 libera o emulsificante, em condições de excesso de carbono e limitação de nitrogênio, a um pH inicial de 8, em presença de cloreto de sódio de 2 a 3% (ZINJARDE; PANT, 2002).

### **1.3.10 Atividade enzimática em ambientes contaminados por hidrocarbonetos**

As enzimas são biocatalisadores muito utilizados industrialmente, podendo ser empregados na biologia molecular e aplicações biomédicas (SANCHEZ, DEMAIN, 2002), no desenvolvimento de metodologias analíticas, na fabricação de produtos tecnológicos e no tratamento de efluentes. São capazes de atuar em todas as principais macromoléculas biológicas (lipídeos, carboidratos, proteínas e ácido nucléicos), bem como em moléculas menores de açúcares e aminoácidos (CHIRUMAMILLA et al, 2001).

Esses catalisadores são utilizados em indústrias químicas, alimentícias, farmacêuticas, de cosméticos, detergentes e fibras têxteis, dentre outras, por tornarem diversos processos de produção mais eficientes e menos dispendiosos, causando menor impacto no meio ambiente por utilizar temperatura e pressão menores do que os processos químicos tradicionais. Os produtos enzimáticos apresentam excelente qualidade devido à especificidade das enzimas (PEREIRA-JR. et al., 2008 apud BOM; FERRARA; CORVO, 2008).

As enzimas de origem microbiana levam vantagem sobre enzimas vegetais e animais no que dizem respeito aos custos no processo de produção, pois seu tempo de obtenção é menor, além do vasto leque na escolha de substratos de baixo custo que conseqüentemente geram um maior rendimento através da otimização em processos fermentativos (HAKI; RAKSHIT, 2003).

O elevado aumento na produção em larga escala e a utilização das enzimas nos diversos setores industriais é um reflexo de sua especificidade e ação catalítica. Enzimas com mesmo perfil de atuação sob substratos em comum podem apresentar comportamentos diferenciados na presença de pH, temperaturas e condições iônicas distintas. Devido à presença dessas variáveis e das condições que estes catalisadores

orgânicos podem ser utilizados, se faz necessário uma seleção enzimática anterior ao uso industrial (BEISSON et al., 2000; BORNSCHEUER et al., 2002; GUPTA et al., 2004).

Estratégias tradicionais de isolamento, seleção de microrganismos, bem como estudos das características físico-químicas do meio de cultura são de fundamental importância, não apenas para o crescimento celular como também para o rendimento em produto enzimático. As células são capazes de responder aos estímulos químicos e físicos do meio externo através de mecanismos bioquímicos que regulam a expressão gênica e a fisiologia do microrganismo e, conseqüentemente, seu desempenho na formação do produto desejado. Esses mecanismos são acionados, dentre outros fatores por indutores, ativadores e repressores nos processos de produção (MADIGAN et al, 2000 apud BOM; FERRARA; CORVO, 2008).

Em se tratando da importância enzimática num processo biodegradatório, é importante ressaltar que para haver degradação de hidrocarbonetos, como por exemplo, de HAPs, é necessário que o microrganismo utilizado no processo de degradação, utilize o hidrocarboneto como fonte de carbono, adquirindo assim energia para o seu crescimento e que o mesmo possua ou produza no decorrer do processo algumas ou várias enzimas que transformam as complexas moléculas dos HAP's em intermediários comuns das suas rotas catabólicas (JACQUES et al, 2007).

Na biodegradação dos diversos hidrocarbonetos existentes, por exemplo, é necessário que haja uma indução de enzimas degradadoras apropriadas. Este processo envolve a ativação de regiões específicas do genoma microbiano. Quando alguns substratos alvos estão presentes, os microrganismos iniciam reações bioquímicas em cascata que resultam na transcrição de genes (plasmídios) que codificam a síntese das enzimas necessárias para degradar o composto alvo (MARIANO, 2006)

No caso dos HAPs, sua complexidade e a estabilidade da sua estrutura química, devido à ressonância dos anéis aromáticos, a maioria dos microrganismos não possui enzimas capazes de reconhecê-los e degradá-los (JOHNSEN et al., 2005).

Desde a década de 1950, vêm sendo isolados vários fungos, degradadores destes compostos, pertencentes principalmente aos gêneros *Cunninghamella*, *Phanerochaete*, *Fusarium*, *Candida*, *Penicillium*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Aspergillus*, *Bjerkandera*, *Chrysosporium*, dentre outros (CERNIGLIA, 1997; JACQUES et al., 2005a).

O melhor desempenho na degradação de hidrocarbonetos ainda está na utilização dos consórcios microbianos, que demonstra a importância de se considerar o papel do co-metabolismo no tratamento de poluentes recalcitrantes como o óleo diesel, onde cada

espécie tem uma função específica nas seqüências de reações enzimáticas responsáveis pela quebra de cadeias complexas de hidrocarbonetos (MARIANO, 2006).

O mecanismo da degradação de hidrocarbonetos por fungos têm sido pouco estudado, mas provavelmente envolvem oxigenases induzíveis similares as apresentadas por *Mycobacterium* e *Nocardia* (RUDD et al., 1996).

Efeitos de compostos tóxicos, com o óleo diesel ou qualquer outro hidrocarboneto do petróleo sobre populações microbiológicas podem ser monitorados pelo acompanhamento da atividade enzimática proveniente do local contaminado. Clemente et al (2001) cultivaram espécies de fungos em meios contaminados com HAPs, onde a degradação dos mesmos foi monitorada por cromatografia líquida de alta eficiência. Durante as análises foi constatada uma alta degradação de naftaleno por algumas linhagens, e os líquidos metabólicos obtidos dos cultivos apresentaram atividades de manganês-peroxidase, lignina peroxidase e lacase.

Segundo Alexander (1999), uma grande variedade de bactérias, fungos e algas têm a capacidade de metabolizar hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. Fungos filamentosos são conhecidos por seu potencial degradador de HAPs (CERNIGLIA, 1992; GRAMSS et al., 1999).

A biodegradação de alcanos e aromáticos envolve sistemas enzimáticos, os quais são responsáveis pelo ataque primário aos substratos. Dioxigenases são as enzimas chaves na completa mineralização de moléculas monoaromáticas ou de um dos anéis de um sistema poliaromático. Entretanto, hidrocarbonetos poliaromáticos são alvos de ataque de monooxigenases microbianas, onde a atividade destas enzimas resulta na formação de um epóxido, o qual é um intermediário altamente reativo. Epóxidos, por sua vez, podem ser transformados em dióis, através da ação de epóxido hidrolases microbianas (VASCONCELLOS, 2001).

A biodegradação aeróbica de hidrocarbonetos do petróleo, como n-alcanos, aromáticos e HAPs, por microrganismos extremófilos tem sido relatada por Margesin e Schinner (2001). Margesin et al. (2003), investigou a capacidade de várias cepas de leveduras e bactérias adaptadas a ambientes frios, utilizarem frações de hidrocarbonetos do petróleo como substrato para crescimento e produção de várias enzimas. Um elevado percentual (89%) das cepas de leveduras mostrou atividade lipolítica, mais de 1/3 das cepas bacterianas produziram amilase,  $\beta$ -lactamase,  $\beta$ -galactosidase ou lipase, e mais de 2/3 foram produtoras de protease. Apenas 6% das cepas bacterianas e 79% das estirpes de levedura utilizaram n-hexadecano como substrato para o crescimento; 13% das cepas bacterianas e 21-32% das estirpes de leveduras utilizaram fenol, fenantreno ou antraceno

como substrato para o crescimento. Apenas quatro cepas de leveduras, e nenhuma das estirpes bacterianas puderam crescer em todos os hidrocarbonetos testados. A biodegradação de fenol foi investigada com culturas em batelada alimentada a 10°C. Três estirpes de leveduras degradaram fenol em concentrações elevadas como 10 mM e 12,5 mM. Das oito cepas bacterianas, duas cepas degradaram até 10 mM de fenol. A melhor temperatura para a degradação do fenol foi 20°C para todas as oito cepas bacterianas e duas estirpes de leveduras. A biodegradação pelas cinco estirpes de leveduras foi boa a 10°C, e mais rápida a 1°C do que a 20°C. Todas as linhagens capazes de degradar fenol apresentaram produção de catecol 1,2 dioxigenase.

### **1.3.10.1 Degradação de compostos fenólicos por lacases e tanases**

Os fenóis estão presentes em baixas concentrações no óleo e produtos refinados do petróleo, como o óleo diesel. Os compostos fenólicos mais abundantes no óleo são aqueles com radicais alquilas contendo de 2 a 9 átomos de carbono (NEFF, 2002).

A lacase (EC 1.10.3.2) é uma fenoloxidase que catalisa a oxidação de vários compostos fenólicos com a concomitante redução de O<sub>2</sub> para H<sub>2</sub>O. Participa também da catalisação e remoção de elétrons e prótons de grupos hidroxifenólicos e aminoaromáticos, formando radicais fenoxi livres e radicais amino, respectivamente (GIESE et al, 2004). Lacases oxidam uma ampla série de fenóis (GARG; MODI, 1999; SHUTTLEWORTH; BOLLAG, 1986), transformando radicais fenólicos em radicais aril-oxi, que se polimerizam espontaneamente e formam complexos insolúveis, podendo ser removidos por precipitação, filtração ou centrifugação (DAVIS; BURNS, 1990). A destoxificação de contaminantes fenólicos é consequência da reação de acoplamento oxidativo (DEC; BOLLAG, 1990).

Para Li et al. (1999), as lacases diferem das peroxidases por não necessitarem do peróxido de hidrogênio para oxidar compostos fenólicos. Em vez disso, os elétrons são transferidos ao oxigênio molecular, produzindo água. Alguns microrganismos apresentam esses dois tipos de exoenzimas óxido-redutases (peroxidases e lacases) ou apenas uma delas (GIESE et al., 2004).

A importância tecnológica das lacases é resultante da capacidade de catalisar a transformação de um grande número de compostos aromáticos fenólicos e não fenólicos (DURAN et al., 2002 apud GIESE et al., 2004). As lacases quando aplicadas no tratamento de efluentes pode ser vantajoso, pois é necessário apenas o oxigênio molecular como acceptor de elétrons para que ocorra a reação enzimática (HUBLIK; SCHINNER, 2000). As lacases têm sido aplicadas em diferentes processos em indústrias farmacêuticas, têxteis, de

papel, bebidas e alimentos, e assim como em processos de biorremediação (ALEXANDRINO et al., 2007).

A tanase ou tanino acil hidrolase (EC 3.1.1.20) é uma enzima extracelular induzível, com capacidade para hidrolisar ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis, produzindo glicose e ácido gálico (BANERJEE et al., 2001). Pode ser obtida por fontes vegetais, animais e produzida por fungos, bactérias e leveduras (BANERJEE; KAR, 2000) pelas fermentações sólida, líquida ou submersa (LEKHA; LONSANE, 1994). As tanases microbianas são mais estáveis do que as demais. Além disso, microrganismos podem produzir tanases em larga escala e de maneira contínua, propiciando um aumento de rendimento, dependendo das condições estabelecidas no seu processo de produção (BANERJEE et al., 2001). Enzimas extracelulares são preferidas, pois são mais fáceis de serem extraídas e dispensam os métodos de extração dispendiosos (COURI et al., 1998).

A tanase apresenta pH estável na faixa de 3.5 - 8.0, com pH ótimo entre 5.5 - 6.0, temperatura ótima na faixa de 30 – 40 °C, estabilidade térmica entre 30 e 60 °C, ponto isoelétrico de 4.0 - 4.5 e massa molecular entre 180 e 300 kDa. Essas propriedades dependem fortemente das condições de cultura e também da linhagem utilizada (BATTESTIN et al., 2004).

Industrialmente, existe um grande potencial para a aplicação das tanases, mas poucas são empregadas de maneira efetiva devido ao elevado custo de produção, além do que, a sua ação catalítica ainda não está totalmente clara devido a grande diversidade dos substratos (taninos) e a biodiversidade microbiana que sintetiza a enzima. Essa enzima pode ser aplicada na clarificação de sucos, na fabricação de cervejas e vinhos favorecendo a remoção de compostos fenólicos, cosméticos e remédios, e atualmente, é empregada na produção de ácido gálico, chás instantâneos, ração animal, na estabilização da coloração de vinhos, refrigerantes a base de café, processo de tratamento de couro, e ainda em tratamento de efluentes (BANERJEE et al., 2001; MACEDO et al., 2005; AGUILAR et al., 1999).

Para viabilização do uso de tanase, faz-se necessária investigar a produção de tanase fúngica em escala industrial, mas ainda não se tem um completo entendimento a respeito da regulação, capacidade catalítica, especificidade e aspectos apesar de vários microrganismos produzirem tanase, essas não são igualmente ativas com todos os taninos hidrolisáveis (BATTESTIN et al., 2004)

A linhagem identificada como *Candida* sp K1 na presença de ácido tânico, produziu tanase extracelular. *Candida* é a única linhagem de levedura, estudada como produtora de tanase (BATESTIN et al., 2004). Degradação de tanino por levedura não tem sido estudada

em todo seu potencial. Aoki et al. (1976) isolou e relatou a degradação enzimática de galotananos por levedura pertencentes à espécie *Candida* que foi capaz de produzir tanase.

### **1.3.10.2 Atividade lipolítica em ambientes contaminados por óleo diesel**

As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas pertencentes ao grupo das serinas hidrolases, catalisam a quebra de ligações ésteres de acil gliceróis, e acomodam cerca de 300 aminoácidos. Esta classe enzimática não requer co-fatores, e atuam em uma larga faixa de pH. Além de participarem de reações de hidrólise, podem também exercer atividade catalítica (SARKAR et al., 1998; SCHMIDT-DANNER, 1999).

As lipases são amplamente encontradas na natureza podendo ser extraídas de animais, vegetais e produzidas por microrganismos. Lipases de fontes microbianas recebem atenção especial devido a sua atual e potencial aplicação na indústria, principalmente na de detergentes, óleos e gorduras, fábrica de laticínios e indústria farmacêutica (SHIRAZI et al., 1998; DRIKS, 2002; SAXENA et al., 2003), sendo também empregadas em análises clínicas na avaliação de triglicérides e glicerol.

Industrialmente podem ser empregadas na obtenção de aditivos para lavagem, como os detergentes, na indústria alimentícia, na preparação de substitutos do chocolate amargo e produção de sabores especiais. Além disso, tem sido usada na indústria de cosméticos, produção de bronzeadores, nas diversas reações de transesterificação de triglicérides, e também nos tratamentos de esgotos (PANDEY et al., 1999). As lipases também têm sido empregadas em processos de extração de óleos, através do melhoramento das propriedades físicas e nutricionais de gorduras por interesterificação (BRADDOO et al., 1999; SHARMA et al., 2001; BORNSCHEVER et al., 2002).

De acordo com Margesin et al. (2002), solos com histórico recente de contaminação por HAP's, apresentam elevada atividade da lipase. Por outro lado Margesin et al. (2002), também afirmam que os metais pesados presentes nos resíduos petroquímicos podem inibir a atividade lipolítica.

Margesin, Zimmerbauer e Schinner (1999), afirmam que uma contaminação por hidrocarbonetos do petróleo no solo causou uma indução da atividade lipolítica, e a presença de nutrientes inorgânicos induziu significativamente a atividade da mesma. A hipótese de indução enzimática também é confirmada pelo fato da atividade lipolítica no solo aumentar com a elevação da taxa inicial de petróleo presente em solo contaminado.

Segundo Margesin e Schinner (2001), a atividade lipolítica pode ser utilizada como indicador em processos de biodegradação, conforme mostram seus experimentos que correlacionam significativamente a atividade lipolítica com a concentração residual de hidrocarbonetos provenientes da degradação do óleo diesel. Investigando a viabilidade da biorremediação para solos contaminados de maneira crônica por óleo diesel, e analisando também o método bioestimulativo, o solo pertencente a uma área de geleira foi fertilizado com adubo contendo nitrogênio, fósforo e potássio e comparados aos resultados com o mesmo solo infertilizado, ou seja, sem o adubo. O experimento foi realizado por três temporadas de verão (Julho de 1997 a Setembro de 1999), e controlado através das mudanças de concentrações de hidrocarbonetos no solo e da evolução da contagem microbiana. Uma redução significativa do nível de óleo diesel foi alcançada. No final da terceira temporada de verão (após 780 dias), o nível inicial de contaminação ( $2,612 \pm 70 \mu\text{g}$  de hidrocarbonetos g(peso seco) de soil) foi reduzido em  $(50 \pm 4)\%$  e  $(70 \pm 2)\%$  no solo não fertilizado e fertilizado, respectivamente. No entanto, os níveis de contaminação residual de hidrocarbonetos ainda foram elevados, tendo  $(1,296 \pm 110$  e  $774 \pm 52 \mu\text{g g}$  (peso seco) de solo, no solo não fertilizado e fertilizado, respectivamente.

O monitoramento da atividade lipolítica em solos contaminados por óleo diesel é um valioso indicador da biodegradação. Podendo ainda potencializar seu processo biodegradativo através da inserção de nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio. Fatores de interferência tais como a composição dos componentes contaminante e os níveis de compostos recalcitrantes, podem influenciar na atividade lipolítica dos solos contaminados (MARGESIN; SCHINNER, 2001)

Embora muitos estudos tenham focado na biodegradação como um procedimento para eliminar hidrocarbonetos do meio ambiente, não se encontrou na literatura consultada, relato de pesquisas sobre degradação de óleo diesel e/ou produção de bioemulsificantes/biossurfactantes por *C. lipolytica*, em água do mar natural, suplementada com fontes de nitrogênio e de fósforo, utilizando óleo diesel como única fonte de carbono. Portanto, o presente trabalho pretende investigar e contribuir científica e tecnologicamente para preencher esta lacuna.

## 1.4 Referências bibliográficas

AGUILAR, C. et al. A comparison of methods to determine Tannin Acyl Hydrolase Activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, n. 3, p. 355-361, 1999.

ALBUQUERQUE, C. D. C., CAMPOS-TAKAKI, G. M.; FILETI, A. M. F. On-line biomass estimation in biosurfactant production process by *Candida lipolytica* UCP 988. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p.1367-5435, 2008.

ALBUQUERQUE, C. D. C. **Processo de Produção de Bioemulsificante por *Candida lipolytica*: Otimização, Ampliação de Escala e Desenvolvimento de Softsensor baseado em Redes Neurais Artificiais**, 2006. 340f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Faculdade de Engenharia Química, Universidade de Campinas, Campinas 2006.

ALBUQUERQUE, C. D. C; FILETI, A. M. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Optimizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 575-583, 2006a.

ALBUQUERQUE, C. D. C; FILETI, A. M. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Neural Network Based Software Sensors: Application to Biosurfactant Production by *Candida lipolytica*. In: MENDEZ-VILAS, A. **Modern Multidisciplinary Applied Microbiology: Exploiting Microbes and Their Interactions**, Weinheim: Wiley-VCH, p. 628-632, 2006b.

ALBUQUERQUE, C.D.C., et al. Biosurfactant production by *Candida lipolytica* – study of the culture medium components using factorial design. **Revista Symposium**, v. 1, p.109-15, 2005.

ALEXANDER, M. Biodegradation and bioremediation, **Academic Press**, London, 1999.

ALEXANDRINO, A M. et al. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 364-368, 2007.

AOKI, K.; SHINKE, R.; NISHIRA, H. Purification and some properties of yeast tannase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 79-85, 1976.

API (American Petroleum Institute). Fate of spilled oil in marine waters: Where does it go? What does it do? How do dispersants affect it? **API Publication Number 4691, USA**, 1999.

ARAÚJO, F.S.N. Interface Porto-Navio e o Meio Ambiente. **Informativo Marítimo**, v. 10, n. 3, p. 47-68, 2002.

ARONSTEIN B.N.; CALVILLO, Y.M.; ALEXANDER, M. Effect of surfactants at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil. **Environmental Science & Technology**, v. 25, p. 127-33, 1991.

ATLAS, R. M. Stimulated petroleum biodegradation. **Critical Review in Microbiology**, v. 5, p. 371-386, 1997.

ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiological Reviews**, v. 45, p. 180-209, 1981.

ATLAS, R. M. **Petroleum Microbiology**, New York: Macmillian, p. 435-577, 1984.

BAIRD, C. **Química Ambiental**, São Paulo, Editora: Bookman, 2002.

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA S.S. Potential Applications of Microbial Surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BANERJEE, D.; KAR, B. Biosynthesis of tannin acyl hydrolase from tannin-rich forest residue under different fermentation conditions. **Biotechnol Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 29-38, 2000.

BANERJEE, R.; MONDAL, K.C.; PATI, B.R. Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF 9. **Journal of Basic Microbiology**, v. 41, p. 313-318, 2001.

BARROW, C. W.; ROTHSCHILD, B. J. Beyond crisis science and emergency legislation: What do we really know about oil spills. **Spill Science and Technology Bulletin**, v. 7, n. 1-2, p. 3-6, 2002.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. - Fontes e Aplicações de Taninos e Tanases em Alimentos. **Alimentos e Nutrição – Brazilian Journal of Food and Nutrition**. v. 15, n. 1, p. 63-72, 2004.

BECHER, P. **Emulsions: Theory and Practice**, 2. ed., New York, Editora: Reinhold Publishing, 1965.

BEISSON, F. et al. Methods for Lipase Detection and Assay: A Critical Review, **European Journal of Lipid Science and Technology**. v. 102, p. 133-153, 2000.

BENINCASA, M. et al. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing soapstock as the carbon source. **Journal of Food Engineering**. v. 54, p. 283-288, 2002.

BENTO, D.M. **Análise Química da Degradação dos Hidrocarbonetos de Óleo Diesel no Estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS**, 2005. 109f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica)–Universidade Federal do Rio Grande, 2005.

BERTRAND, J. C. et al. Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture. **Biotechnology Letters**. v. 5, p. 567-572, 1983.

BORNSCHEUER, U. T. et al. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application, **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 433-437, 2002.

CAMEOTRA S. S.; BOLLAG J. M. Biosurfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 111-126, 2003.

CAMEOTRA, S. S.; MAKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 262-266, 2004.

CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2195-2210, 2006.

CAMPOS, A. C.; EPAMIONONDAS, L. **Petróleo e Derivados**, Rio de Janeiro, Editora: Técnica Ltda., 1989.

CERNIGLIA, C. E.; GIBSON, D. T. Algal oxidation of aromatic hydrocarbons: formation of 1-naphthol from naphthalene by *Agmenellum quadruplication* strain PR-6. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 88, p. 50-58, 1979.

CERNIGLIA, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodegradation**, v. 3, p. 351-368, 1992.

CERNIGLIA, G. E.; GIBSON, D. T. Metabolism of naphthalene by *Cunninghamella elegans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 34, p. 363-370, 1977.

**CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental**, 2004. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br> > Acesso em: Abril 2008.

**CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Curso Derrames de óleo no mar e os ecossistemas costeiros** <<http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/cursos/cursos.asp>> Acesso em: Maio 2008.

CHIRUMAMILLA, R. R. et al. Improving the quality of industrially important enzymes by directed evolution, **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 224, p. 159-168, 2001.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in fuel studies of soil remediation. **Journal Applied Microbiology**, v. 93, p. 915-929, 2002.

CLEMENTE, A. R.; ANAZAWA, T. A.; DURRANT, L. R. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons By Soil Fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 255-261, 2001.

COSTA, S. G. V. A. O., et al. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483-488, 2006.

COLWELL, R. R.; WALKER, J. D. Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 5, p. 423-445, 1977.

COURI, S. et al. Seleção de linhagens mutantes de *Aspergillus niger*, para síntese de enzimas hidrolíticas por fermentação em meio semi-sólido. **Ciência & Engenharia**, v.7, n.2, p.29-31, 1998.

CRAPEZ, M. A. C. et al. Biorremediação para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, v. 30, p. 129, 2002.

CRAPEZ, M. A. C. Efeitos dos hidrocarbonetos de petróleo na biota marinha. In: MORAES, R. et al. (Org.), Efeitos de poluentes em organismos marinhos, Rio de Janeiro, p 255-269, **Arte e Ciência Villipress**, 2001.

DAVIS, S.; BURNS, R. G. Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 721-726, 1990.

DEC, J.; BOLLAG, J. M. Detoxification of substituted phenols by oxidoreductive enzymes through polymerization reactions. **Archives of Environmet Contamination and Toxicology**, v. 19, p. 543-550, 1990.

DEL' ARCO, J. P.; FRANÇA, F. P. Influence of oil contamination levels on hydrocarbon biodegradation in sandy sediment. **Environment International**, Elmsford, v.110, p.515-519, 2001.

DUMENIL, G. et al. Application of a Doehiert experimental design to the optimization of microbial degradation of crude oil in sea water by continuous culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 405-409,1988.

DURAN, N. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 31, p. 907-931, 2002

FANG, J.; BARCELONA, M. J. Coupled oxidation of aromatic hydrocarbons by horseradish preoxidase and hydrogen peroxide. **Chemosphere**, v. 50, p. 105-109, 2003.

FRONAPE. **Plano de emergência para derrames de hidrocarbonetos**. PETROBRAS-FRONAPE, Inspetoria Geral, Rio de Janeiro, RJ, 2002a.

GARG, S. K. E MODI, D. R. Decolorization of pulp-paper mill effluents by white-rot fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 19, p. 85-112, 1999.

GAYLARDE, C. C.; BENTO, F. M.; KELLEY, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. **Revista de Microbiologia**, v.30, p.01-10, 1999.

GENTRY, T. J.; RENSING, C.; PEPPER, I. L. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 34, p. 447-494, 2004.

GIESE, E. C. et al. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. **Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringa**, v. 26, n. 4, p. 463-470, 2004.

GRAMSS G.; VOIGHT, K. D.; KIRSCH B. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with three to seven aromatic rings by higher fungi in sterile and unsterile soils. **Biodegradation**, v. 10, p. 51–62, 1999.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 763-781, 2004.

HAKI, G.D.; RAKSHIT, S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review, **Biosource Technology**, v. 89, 17-34, 2003.

HARAYAMA, S. et al. Petroleum biodegradation in marine environments. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 1, p. 63-70, 1999

HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, N. Y.; OCHOA, J. L.; VÁZQUEZ-DUHAL, T. R.; Effect of salinity in the growth of the marine yeast *Rhodotorula rubra*. **Microbios**, v.80, p. 99-106, 1994.

HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, N. Y.; HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, D.; OCHOA, J. L. Factors affecting the distribution of the Genus *Candida* (Berkhout) along the West coast of Baja California Sur, Mexico. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 18, p. 109-112, 1995.

HUBLIK, G. E.; SCHINNER, F. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 330-336, 2000.

IMO - **International Maritime Organization**, 2003. Disponível em: <<http://www.imo.org>> Acesso em: fevereiro 2008.

IMO - **International Maritime Organization**, 2004. Disponível em: <<http://www.imo.org>> Acesso em: fevereiro 2008.

INTERTANKO - **The International Association of Independent Tanker Owners**, 2003. <<http://www.intertanko.com>> Acesso em: Janeiro 2008.

ITOPF - **The International Tanker Owners Pollution Federation Limited**, 2003. <<http://www.itopf.com>> Acesso em: Junho 2008.

JACOBUCCI, D. F. C. **Estudo da influência de biossurfactantes na biorremediação de efluentes oleosos**, 2000. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

JOHNSEN, A. R.; WICK, L. Y.; HARMS, H. Principles of microbial PAH-degradation in soil, **Environmental Pollution**, v. 133, p. 71–84, 2005.

JONES, L. Shrinking of Aral Sea Causes Regional Health Crisis. **Washington Report on Middle East Affairs**, p 28-29, 1999.

JORGENSEN, K. S.; PUUSTINEM, J.; SUORTTI, A. M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. **Environment International**, Elmsford, v.107, p. 245-254, 2000.

PREIRA-JR, N.; BOM, E. P. S.; SÁ-PEREIRA P.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; ROSEIRO, J. C. Bioprocessos para Produção de Enzimas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; **Enzimas em Biotecnologia. Produção, Aplicações e Mercado**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda., 2008, p.95-122

KATAOKA, A. P. A. G. **Biodegradação de resíduos oleosos de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de landfarming**, 2000. 202f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

KHANNA, R. C.; BARUA, T. K. Effects of marine oil spills. In: 4th Indian Oil Corp. Ltd. Int. Petrol. Conf. **Petrotech**, Nova Deli, Índia, p. 9-12 Janeiro, 2001.

KINGSTON, P.F. Long-term environmental impact of oil spills. **Spill Science and Technology Bulletin**, v. 7, n 1-2, p.53-61, 2002.

KINGSTON, P. F.; RUNCIMAN, D.; McDOUGALL, J. Oil contamination of sedimentary shores of the Galápagos Island following the wreck of Jessica. **Marine Pollution Bulletin**, v. 47, p 303-312, 2003.

KOSARIC, N. Biosurfactants and their applications for soil bioremediation. **Food Technology and biotechnology**, Zagreb, v. 39, n. 04, p. 295-304, 2001.

LAHA, S.; LUTHY, R. J. Effect of non-ionic surfactants on the solubilisation and mineralisation of phenanthrene in soil-water systems. **Biotechnology Bioengineering**, v. 40, p. 1367-380, 1992.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, v. 54, p. 305-315, 1990.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Comparative titres, location and properties of Tannin Acyl Hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. **Process Biochem.** v. 29, p.497-503, 1994.

LI, K.; XU, F.; ERIKSSON, K. E. Comparison of fungal laccases and edox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.2654–2660, 1999.

LIBES, S. M. The fate of pollutants in the coastal ocean. In: LIBES, S. M. (Org.). **An introduction to marine biogeochemistry**. Editora John Wiley and Sons, 1992.

LOBATO, A. K. C. L. **Estudo cinético da síntese de biossurfactantes**, 2000. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2000.

MACEDO, G. A.; MATSUDA, L.K.; BATTESTIN, V. Seleção de Fungos Produtores de Tanase em Resíduos Vegetais Ricos em Taninos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 4, p. 833-838, 2005

MacGILLIVARY, A. R.; SHIARIS, M. P. Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1613-1668, 1993.

MACKAY, D. M. et al. A controlled field evaluation of continuous vs. pulsed pump-and-treat remediation of a VOC-contaminated aquifer: site characterization, experimental setup, and overview of results. **Journal of Contaminated Hydrology**, v. 41, p. 81-131, 2000.

MADIGAN et al, Bioprocessos para Produção de Enzimas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia. Produção, Aplicações e Mercado**. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda. p.95-122, 2008.

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

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

MANEERAT, S. Biosurfactants from marine microorganisms. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v.27, n..6, p. 1263-1272, 2005

MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SCHINNER, F. Soil lipase activity – a useful indicator of oil biodegradation. **Biotechnology Techniques**. v.13, p. 859–863, 1999.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 3127–3133, 2001.

MARGESIN, R.; ZACKE, G.; SCHINNER, F. Characterization of heterotrophic microorganisms in alpine glacier cryoconite. **Arctic, Antarctic, and Alpine Research (AAAR)**, v. 34, p.88–93, 2002.

MARGESIN, R. et al. Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold-adapted bacteria and yeasts. **Extremophiles**. v. 7, p. 451–458, 2003.

MARIANO, A. P. **Avaliação do Potencial de Biorremediação de Solos e de Águas Subterrâneas Contaminados com Óleo Diesel**, 2006. 147f. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente)-Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

MATSUURA, Y. **The role of the ocean in feeding three hundred million tons weight of human beings**. In: Global Change Open Science Conference, Amsterdam.: IGBP Secretary, v. 1, 2001.

MATTEI, G. et al. Fermentation procedure of a crude oil in continuous culture on seawater. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 23, p.302-304, 1986.

MAZZUCO, L.M. **Atenuação Natural de Hidrocarbonetos Aromáticos em Aquíferos Contaminados com Óleo diesel**, 2004. 86f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

MEIRA, J. A. **Produção de biosurfactantes por fermentação no estado sólido e desenvolvimento de aplicações para tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos**, 2007. 94f. Dissertação (Mestrado em Química)–Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MISHRA, S. et al. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.4, p.1675-1681, 2001.

MULLIGHAN, C. N.; GIBBS, B. F. Factors influencing the economics of biosurfactants. In: KOSARIC, N. (Org.). **Biosurfactants: production, properties, applications**. Marcel Dekker, Inc., NewYork, p.329-371, 1993.

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

NEFF, J. M. **Effect of contaminants from oil well produced water**. Bioaccumulation of marine organism. London: Elsevier, 2002, 452p.

NITSCHKE M.; PASTORE G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. Rhamnolipid surfactants: An update on the general aspects of these remarkable biomolecules. **Biotechnological Progress**, v. 21, p. 1593-1600, 2005a.

NITSCHKE, M. et al. Oil waste as unconventional substrate for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnological Progress**, v. 21, p. 1562-1566, 2005b.

OBERBREMER, A.; MULLER-HURTING, R.; WAGNER, F. Effect of addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**. New York, v. 32, p. 485-489, 1990.

OCHOA, J. L. R.; VÁZQUEZ-JUÁREZ, R. Las levaduras marinas como herramientas científica y biotecnológica. Marine yeasts as scientific and biotechnology tools. **Universidade e Ciência**, v. 1, p.39-50, 2004.

PATIN, S. **Environmental Impact of the offshore oil and gas industry**. 1. ed. East Northport, NY: USA, Editora Ecomonitor Publishing, Dezembro, 1999, 448p.

**PETROBRAS – Curso de Prevenção, Contenção e Combate a poluição por óleo em corpos d'água**. Disponível em: <<http://www.ppe.ufrj.br/pppe/production/tesis/prdasilva.pdf>> Acesso em: Abril 2008.

**PETROBRAS.** Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br>> Acesso em: Fevereiro 2008.

**PETRÓLEO BRASILEIRO S/A** - Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br/português/index.asp>> Acesso em: Janeiro 2009.

PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos.** 2006. 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

POFFO, I. R. F. **Vazamentos de óleo no litoral norte do estado de São Paulo: Análise histórica (1974 a 1999).** 2002. Dissertação (Mestrado em Ciência Ambiental). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2000.

RAHMAN, K. S. M. et al. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low cost raw materials. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 1277-1281, 2002.

RAMASWAMI, A.; LUTHY, R. Measuring and modeling physicochemical limitations to bioavailability and biodegradation. In: HURST, C. J. Et al. (Org.). **Manual of environmental microbiology**, ASM Press, Washington DC, p. 721-729, 1997.

RAMÍREZ-OROZCO, M. et al. CHOA J. L. Cell yield and Superoxide Dismutase activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* under different culture conditions. **Journal of Marine Biotechnology**, v. 6, p.255-259, 1998.

REDDY, P. G. et al. Predominant role of hydrocarbon solubilisation in the microbial uptake of hydrocarbons. **Biotechnology Bioengineering**, v 24, p. 1241-269, 1982.

REISFIELD, A.; ROSENBERG, E.; GUTNICK, D. Microbial degradation of crude oil: factors affecting the dispersion in sea water by mixed and pure culture. **Applied Microbiology**, v. 24, p. 363-368, 1972.

ROSEN, R. **Fundamentals of Measurement and representation of Natural Systems.** New York :North-Holland, 1978.

ROSENBERG, M. Bacterial adgerance to hydrocarbons: a useful technique for studying hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 22, p. 289-95, 1984.

RUDD, L. E. et al. Changes in mutagenicity during crude oil degradation by fungi. **Biodegradation**, v. 7, p. 335-343, 1996.

SAMSON, R. et al. Biotechnologies appliqué es a` la restauration de sites contamine´ s avec d'application d'une technique physico chimique et biologique pour les sols contamine´ s par des BPC. **Science et Techniques de l'Eau**. v. 23, p. 15–18, 1990.

SANCHEZ, S. ; DEMAIN, A. L. Metabolic regulation of fermentation processes, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 895-906, 2002.

SARUBBO, L. A. et al. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 59-67, 2001.

SILVA, P. R. **Transporte marítimo de petróleo e derivados na costa brasileira: estrutura e implicações ambientais**. 2004. 148 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia – Ciências e Planejamento Energético). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

SONG, C.; HSU, C.S.; MOCHIDA, I. **Chemistry of Diesel Fuels**. Ed. Taylor and Francis, p. 18-19, 2000.

SOUZA, M. N. **Experimentos de Físico-Química**, 2. ed., Curitiba: Neoprinte Ltda. p. 24-25, 1995.

SHUTTLEWORTH, K. L.; BOLLAG, J. M. Soluble and immobilized laccase as catalysts for the transformation of substituted phenols. **Enzyme and Microbial Technoogy**, v. 8, p. 171-177, 1986.

SPILBORGHS, M. C. F. **Biorremediação de aquífero contaminado com hidrocarboneto**. Dissertação (Mestrado). Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, 1997.

**TRANSPETRO**, 2004. Disponível em: <<http://www.transpetro.com.br>> Acesso em: Março 2008.

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

VANCE-HARROP, M.H. et al. Produção de biosurfactante em meio de cultura de baixo custo suplementado com óleo de milho por *Candida lipolytica*. **Revista Symposium**, v. 2, p.23-27, 1999.

VANCE-HARROP, M.H. **Influência de fontes de carbono D-glicose e óleo de babaçu no crescimento de *Candida lipolytica* e na produção de biosurfactantes**, 2000. 72p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2000.

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

VANCE-HARROP, M.H.; BUARQUE-GUSMÃO, N.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. **Influência da Água do Mar na Produção de Surfactantes por *Candida lipolytica***. In: VII Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, Recife. Resumo... Recife, 2000. p.141.

VANCE-HARROP, M.H.; BUARQUE-GUSMÃO, N.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources. **Braz. J. of Microbiol.** v. 34, p.120-123, 2003.

VANCE-HARROP, M.H.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. **Degradação e Remoção de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos através do Uso de Surfactantes Sintético e produzidos por *Candida lipolytica***. In: 2ª Mostra UNICAP de Pesquisa, Pós-Graduação e Extensão, Recife. Resumo... Recife, 2001. p.92, 2001.

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

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 1. physiological aspects. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 604-620, 2006.

VASCONCELLOS, S. P. **Atividades Enzimáticas e de Biodegradação de Microrganismos do Petróleo da Bacia de Campos (Pampo Sul)**, 2006. 218f. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade de Campinas, Campinas, 2006.

VASUDEVAN, N.; RAJARAM, P. Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. **Environment International**, Elmsford, v.26, p.409-411, 2001.

VOLKERING, F. et al. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 548-52, 1993.

WALKER, D. et al. **Oil in the sea : changes in the nature of sources and inputs since 1985**. In: International Oil Spill Conference. Bristish Columbia, Canadá, Abril, 2003.

WALKER, J.D. et al. Petroleum degrading achlorophyllous alga *Prototbeca zopfi*. **Nature**. London, v. 254, p. 423-434, 1977.

WANG, X.; YU, W.; BARTHA, R. Effect of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbons residues in soil. **Environmental and Science Technology**, v. 24, p.1086-1089, 1990.

YAMAMOTO, C. I.; SOUZA, T.B., GROTZNER, M. B. **Identificação do Óleo Diesel Interior e Metropolitano no Estado do Paraná através de Análise de Componentes Principais-PCA**. In: 4º PDPETRO, Campinas, SP. v. 21-24, p.1-7, 2007.

ZHANG, G. et al. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. **Journal of Zhejiang University Science**, Hangzhou, v. 6B, n. 8, p. 725-730, 2005.

ZINJARDE, S. et al. Isolation of an emulsifier from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 using a modified mini isoelectric focusing unit. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 117-121, 2003.

ZINJARDE, S.S.; PANT, A. - Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. **Journal of Basic Microbiology**, v. 42, p. 67-73, 2002.

## CAPÍTULO 2

# Biodegradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* em água do mar

F. A. S. D.Souza<sup>1</sup>,  
G. M.Campos-Takaki<sup>2,4</sup>, A. A.Salgueiro<sup>2,4</sup> e  
C. D. C.Albuquerque<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>*Programa de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Recife, PE, Brasil.*

<sup>2</sup>*Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE*

<sup>3</sup>*Curso de Ciência da Computação, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE*

<sup>4</sup>*Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), UNICAP, Rua Nunes Machado, 42, Bloco J, Térreo, Boa Vista, Recife, PE, Brasil*

Autor para correspondência: Fone:+55-81-21194017 Fax:: +55-81-21194043  
e-mail:cdaisy@unicap.br

\*Manuscrito a ser submetido ao periódico Biodegradation

## Resumo

A levedura *Candida lipolytica* foi capaz de degradar óleo diesel em água do mar, suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo e produzir biosurfactante/bioemulsificante (BS/BE) com potencial de aplicação em biorremediação ambiental. A habilidade de produção de BS/BE por *C.lipolytica* foi avaliada. Medidas de atividade de emulsificação e tensão superficial foram utilizadas para monitorar a produção de BS/BE. A influência de fatores ambientais (pH, composição do meio, salinidade e tipo de fonte de carbono) sobre o crescimento celular e a produção de BS/BE foi também investigada utilizando um conjunto de três planejamentos fatoriais. A biodegradação de óleo diesel foi confirmada através de experimentos na presença de: (1) água do mar + óleo diesel; (2) água destilada + óleo diesel; (3) água do mar + óleo de milho e (4) água do destilada + óleo de milho. O melhor resultado para biodegradação de óleo diesel 5% (v/v) foi obtido com água do mar suplementada com 1,0% (p/v) de sulfato de amônio e 1,0% (p/v) de fosfato monobásico de potássio. Nesta condição, após 96 horas, o pH, a salinidade, a tensão superficial e as atividades de emulsificação para emulsões água-em-óleo de milho e emulsões óleo de motor-em-água foram iguais a 9,47, 44‰, 46,63 mN/m, 5,49 e 6,00 UAE, respectivamente. O melhor resultado para produção de BE/BS, usando óleo de milho 5% (v/v) como fonte de carbono foi obtido na condição 4, usando água destilada suplementada com 1,0% (p/v) de sulfato de amônio e 1,0% (p/v) de fosfato monobásico de potássio. Nesta condição, após 96 horas, o pH, a salinidade, a tensão superficial e as atividades de emulsificação para emulsões água-em-óleo de milho e emulsões óleo de motor-em-água foram iguais a 6,16‰, 26,01 mN/m, 5,54 e 6,00 UAE, respectivamente. Estes resultados indicam que a levedura *C.lipolytica* pode ser aplicada em biorremediação e bio-refino na indústria do petróleo.

**Palavras-chaves:** biodegradação, óleo diesel, água do mar, *Candida.lipolytica*, bioemulsificante, biosurfactante.

## Abstract

The yeast *C.lipolytica* UCP988 was able to degrade diesel oil in seawater, supplemented with nitrogen and phosphorus sources and to produce emulsifier/surfactant with potential of application in environmental bioremediation. The ability of bioemulsifier/biosurfactant (BE/BS) production by *C.lipolytica* was evaluated. Emulsification activity and surface tension measurement were used to monitor the bioemulsifier/biosurfactant production. The influence of environmental conditions (pH, medium composition, salinity and type of carbon source) on cell growth and BE/BS production was also investigated using a set of three full factorial designs. The biodegradation of diesel oil was confirmed through four laboratory experiments using: (1) seawater + diesel oil; (2) distilled water + diesel oil; (3) seawater + corn oil and (4) distilled water + corn oil. The best result for 5% (v/v) diesel degradation was obtained at condition 1, using seawater supplemented with 1,0% (p/v) of ammonium sulfate and 1,0 % (p/v) of potassium dihydrogen orthophosphate. In this condition, after 96 h, the pH, the salinity, the surface tension, the emulsification activities to water-in-corn oil and motor oil-in-water emulsions were equal to 9,47, 44‰, 46,63 mN/m, 5,49 and 6,00 UAE, respectively. The best result for BE/BS production using 5% (v/v) corn oil as carbon source was obtained to condition 4 using distilled water supplemented with 1,0% (p/v) of ammonium sulfate and 1,0 % (p/v) of potassium dihydrogen orthophosphate. In this condition, after 96 h, the surface tension, the pH, the salinity, the surface tension, the emulsification activities to water-in-corn oil and motor oil-in-water emulsions were equal to 6, 16‰, 26,01 mN/m, 5,54 UAE and 6,00 UAE, respectively. These results indicates that the yeast could be useful for bioremediation and bio-refining application in petroleum industry.

**Key-words:** biodegradation, diesel oil, seawater, *Candida lipolytica*, bioemulsifier, biosurfactant

## Introdução

Poluição por óleo diesel é um problema ambiental de importância crescente. Derramamentos de óleo diesel originários de rupturas de tubulações, falhas de tanques e vários problemas de armazenagem de produção e de acidentes durante o transporte são as mais freqüentes causas de poluição de solos e águas subterrâneas (Bossert et al., 1984; Margesin, Schinner, 1997; Lee et al., 2006). Um importante fator que afeta a degradação microbiana é a hidrofobicidade do óleo diesel que limita sua transferência para a superfície das células dos microrganismos. Essa limitação pode ser superada ou pela adição de agentes de superfície ativa ou surfactantes, ou pelo crescimento de microrganismos produzindo surfactante. Isto por sua vez aumenta a biodisponibilidade de óleo diesel para microrganismos (Miller, 1995; Herman et al., 1997).

Biossurfactantes e emulsificantes microbianos têm sido usados para dispersar poluição criada por operações com navios e derramamentos de óleos em ecossistemas marinhos (Reisfeld et al., 1972). Durante a biodegradação, o óleo bruto é usado como fonte de carbono orgânico pelo processo microbiano, resultando na quebra de componentes do óleo bruto em compostos de baixo peso molecular. Portanto, a biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos é usualmente baixa e assim limita a taxa de degradação deles no meio aquoso. O uso de biossurfactantes tem mostrado aumentar a degradação de óleo bruto (Urum et al 2004; Balba et al. 2002) e outros hidrocarbonetos (Nakahara et al. 1981). Muitos microrganismos degradadores de óleo produzem produtos de superfície ativa extracelulares para aumentar a utilização de substratos oleosos através do aumento da solubilidade do óleo ou dispersão (Bai et al. 1977; Noordman and Janssen, 2002; Abalos et al. 2004). Alguns microrganismos, entretanto, não podem produzir biossurfactantes, mas são ainda capazes de degradar efetivamente substratos oleosos via formação de

bioemulsificantes extracelulares ou aderidos à superfície da membrana celular tais como exopolissacarídeos (Lin et al. 2008).

Um número considerável de estudos sobre bactérias e fungos terrestres e aquáticos degradadores de hidrocarbonetos e produtores de biossurfactantes e emulsificantes tem sido publicado na literatura. Existem também vários relatos sobre degradação de hidrocarbonetos melhorada pela adição de biossurfactante ou surfactante químico (Boonchan et al. 1998; Stelmack et al. 1999; Rahman et al. 2003; Kuyukina et al. 2005). Estudos sobre efeitos da produção de biossurfactante *in situ* por co-cultura de bactéria produtora de biossurfactante e degradadora de hidrocarboneto, embora em menor número, também tem sido alvo de pesquisas (Dean et al., 2001). Entretanto, leveduras marinhas não têm sido estudadas extensivamente para produção de surfactantes e emulsificantes usando hidrocarbonetos derivados de petróleo como única fonte de carbono. A levedura *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 isolada de água do mar contaminada perto de Bombay, produziu um complexo lipídeo-carboidrato-proteína, termoestável, com propriedades emulsificantes, quando crescida em um meio de água do mar artificial, contendo 1% (v/v) de n-hexadecano, como única fonte de carbono (Zinjarde et al. 2003). O biossurfactante produzido apresentou amino-ácidos com composição semelhante a do biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* (Pareilleux 1979). O emulsificante foi capaz de estabilizar emulsões óleo-em-água com hidrocarbonetos aromáticos, tais como tolueno, xileno, benzeno e l-metil-naftaleno. Com óleo bruto e n-alcanos, as gotas dispersadas separaram em duas fases e, portanto a formação da emulsão foi instável. Singh e Desai (1989) descreveram um emulsificante de *Candida tropicalis* também ativo sobre hidrocarbonetos aromáticos, embora as culturas tenham crescido sobre n-alcano, como única fonte de carbono.

A água do mar usada na formulação de meios de cultivos para desenvolvimento de leveduras marinhas favorece seu crescimento de forma seletiva e reduz riscos e custos derivados de contaminação. Esta contaminação se observa usualmente em processos que utilizam água destilada como solvente e se presume que com água do mar seja reduzida.

Outra vantagem do uso de água do mar na formulação dos meios de cultivo para produção de biomassa é que proporciona minerais e nutrientes que complementados com baixas concentrações de extrato de levedura e peptona permitem rendimentos que se equiparam aos de processos industriais (Ramírez-Orozco et al. 1998). No caso das leveduras marinhas, as vantagens inerentes ao uso de água do mar como solvente no processo de fermentação, fornece a oportunidade de trabalhar em condições que eventualmente podem traduzir-se em oportunidades econômicas (Ochoa and Vasquez-Juarez, 2004).

O número de estudos em laboratório e em campo sobre biorremediação de derramamentos de óleo marinhos é ainda bastante limitado. Poluição de ecossistemas marinhos devido a produtos leves de petróleo, como gasolina, é tratada eficientemente por fatores naturais físico-químicos; combustíveis mais pesados, como os óleos diesel, levam meses para completa remediação natural devido a sua baixa volatilidade. O óleo diesel é formado por uma mistura de n-parafinas, parafinas ramificadas, ciclo-parafinas e hidrocarbonetos aromáticos. Alcanos normais e ramificados tem sido extensivamente, estudados pelo seu metabolismo microbiano. Alcanos superiores, frequentemente devido à baixa volatilidade, requerem tempo relativamente mais longo para sua degradação microbiana (Pavitrán et al. 2006).

Biorremediação bem sucedida de sistemas contaminados por petróleo e seus derivados, requer conhecimento das características do lugar e dos parâmetros que afetem a biodegradação microbiana dos poluentes (Sabate et al. 2004). Diversos fatores afetam a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo. Exemplos típicos destes fatores limitantes são: composição química dos hidrocarbonetos de petróleo, estado físico, imtempismo, temperatura, nutrientes minerais, reações (pH baixos podem ser limitantes) e microrganismos, entre outros. Nutrientes são muito importantes para biodegradação bem sucedida de poluentes, especialmente nitrogênio, fósforo e em alguns casos ferro (Conney 1984). Dependendo da natureza do local impactado, alguns destes nutrientes podem tornar-se limitantes afetando assim os processos biodegradativos.

Quando um grande derramamento de óleo ocorre em ambientes marinho e de água fresca, o fornecimento de carbono é dramaticamente aumentado e a disponibilidade de nitrogênio e fósforo torna-se o fator limitante para a degradação de óleo (Atlas 1984). Isto é mais pronunciado em ambientes marinhos, devidos aos baixos níveis de nitrogênio e fósforo na água do mar (Floodgate 1984), ao contrário de sistemas de água fresca nos quais os nutrientes regularmente flutuam devido à recepção de efluentes domésticos e de água de chuva provenientes de áreas agrícolas (Cooney 1984). Entretanto, concentrações excessivas de nutrientes podem inibir a atividade de biodegradação (Challain et al. 2006), e vários autores tem relatado o efeito negativo de altos níveis de nitrogênio, fósforo e potássio sobre a biodegradação de hidrocarbonetos (Oudot et al. 1998; Chaineau et al. 2005) e mais especialmente sobre os aromáticos (Carmichael and Phaender 1997).

No ambiente aquático, a entrada e aderência de microrganismos à camada de óleo é importante para sua efetiva utilização. Esta aderência é dependente de vários mediadores, tais como bioemulsificantes. Desde que a dispersão de óleo no ambiente é função de duas fases e é dependente de compostos de superfície ativa tais como bioemulsificantes produzidos por estes organismos para estabilizar emulsões, o papel de biosurfactantes e bioemulsificantes é de primordial importância na biorremediação de óleos (Pavitran 2006).

Vários pesquisadores têm descrito o fenômeno de aderência microbiana ao óleo e à interface óleo-água, considerando-o dependente das diferentes especificidades das propriedades bioquímicas da superfície celular para óleo (Kappeli and Fiechter 1984; Rosenberg 1984; Singh and Desai 1985). Além disso, é relatado que a capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos é direta ou indiretamente influenciada pelos mediadores microbianos, afetando a sua adesão ao óleo ou a interface óleo-água (Neu and Pralla 1996), mas o acesso ao óleo, também é um requisito primário importante para a sua degradação (Miura 1978; Mihelcic et al. 1995; Bruheim et al. 1997). Diante destes fatos, microrganismos são considerados mais eficientes na utilização de óleo, quando possuem um sistema de enzimas bioquímicas capazes de degradar o óleo, aliadas a um elevado grau de aderência

ao mesmo. A literatura ressalta a importância de se estudar a capacidade enzimática desses microrganismos para degradar óleo, juntamente com as propriedades de aderência ao óleo em relação a mediadores, tais como bioemulsificantes (Ratledge 1980.; Herman et al. 1997; Lee et al. 2006).

Este trabalho teve como objetivo investigar a degradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* UCP 988, em água do mar, assim como o potencial de produção de emulsificantes/surfactantes e enzimas por esta levedura durante o referido processo degradativo.

## Material e Métodos

### Microrganismo e Meio de Preservação

A levedura *Candida lipolytica* UCP 988 foi obtida da coleção do banco de culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco. As colônias de leveduras foram mantidas em 4° C, em tubos de ensaio com o meio YMA (*Yeast Mold Agar*) inclinado, contendo 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 10 g/L de D-glicose, 5 g/L de triptona e 15 g/L de agar. O pH foi ajustado para 5,0 com HCl. Transferências usando técnicas assépticas foram realizadas mensalmente para placas com agar para assegurar a viabilidade celular.

### Óleo Diesel

O óleo diesel usado nos experimentos foi óleo diesel do tipo B, conhecido como “metropolitano”, comercializado em Posto Petrobrás para utilização em motores de ciclo diesel (ônibus, caminhões, carretas, veículos utilitários, etc.) e em instalações de aquecimento de pequeno porte. Este óleo encontra-se disponível nas regiões metropolitanas das principais capitais brasileiras, incluindo a do Recife. Caracteriza-se por possuir hidrocarbonetos parafínicos, naftênicos e aromáticos (10-40% v/v), teor de enxofre (CAS 7704-34-9, orgânico) de no máximo 0,05% p/p (500ppm) e impurezas de compostos nitrogenados e de compostos oxigenados e aditivos (FISPQ 007, 2008). A mistura óleo diesel/biodiesel metropolitano comercializada na região metropolitana do Recife é do tipo B4, ou seja, com teor de biodiesel igual a 4% segundo resolução da Agência Nacional de Petróleo (ANP nº 13, 2008)

## Água do Mar

A água do mar usada nos meios de produção foi coletada em garrafas de polietileno com capacidade de 2000 mL, em praia próxima à Refinaria Abreu e Lima, no Porto de Suape, Pernambuco, em junho de 2008, e após filtração para retirada de sólidos em suspensão, apresentou salinidade igual a a 37‰, gravidade específica igual a 1026 kg m<sup>-3</sup>, pH igual a 8,22 e tensão superficial igual a 53,43 mN/m. A caracterização físico-química da água coletada foi realizada no Laboratório de Análises Minerais, Solos e Água do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco e está especificada na Tabela 1. A composição dos seis principais íons presentes na água do mar de água do mar e a abundância relativa dos mesmos está apresentada na Tabela 2. Outros sais que normalmente constituem cerca de 0,7% da água do mar não foram considerados.

### Determinação da salinidade

As salinidades e densidades (gravidades específicas) da água do mar e dos cultivos livres de células foram determinadas através de refratômetro de mão sem compensação automática de temperatura, escala entre 0 e 100‰ (ppt) de salinidade e 1000 a 1070 de gravidade específica, resolução 0,7‰. Uma amostra de água do mar estéril filtrada (tomada da superfície com auxílio de uma micropipeta) foi colocada sobre o prato do refratômetro, que foi mantido contra a luz. A leitura da salinidade em parte por mil e da gravidade específica foi realizada através do visor do refratômetro (Albuquerque 2006).

### Quantificação microbiana

As concentrações de células de *C. lipolytica* no inóculo e nos meios de produção foram determinadas através de contagem em câmara de Neubauer, utilizando microscopia

de luz com aumento de 400x. O crescimento microbiano também foi avaliado por contagem de colônias utilizando o meio malte-agar (g/L): extrato de malte 30, peptona 5, agar 15 na presença de clorafenicol 0,1 a pH  $5,4 \pm 0,2$ . As amostras foram assepticamente retiradas do cultivo a 0, 24, 48, 72 e 96 h. As diluições decimais das amostras foram realizadas utilizando água esterilizada as quais foram inoculadas assepticamente em triplicatas. Foi empregada a técnica de *Pour Plate* e as amostras foram incubadas a 28 °C por 48 h de acordo com a metodologia do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA 1998). Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).

#### Determinação de atividade de emulsificação

A atividade de emulsificação para emulsão água-em-hexadecano foi determinada de acordo com o método descrito por Cirigliano and Carman (1984). As amostras coletadas durante o crescimento dos microrganismos foram filtradas através de membrana Milipore® (diâmetro do poro de 0,22  $\mu\text{m}$ ). Alíquotas de 2mL do filtrado livre de células foram transferidas para tubos de ensaio (15x125 mm) com tampa e diluídas com 2 mL de solução tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 3,0). A seguir, foi adicionado 1mL de hexadecano e a mistura, após fechamento do tubo de ensaio, foi submetida à agitação máxima, durante 2 minutos a 25° C, em agitador de tubos (vórtex). A emulsão uniforme resultante foi colocada em repouso por 10 minutos. Após este período, a absorbância foi medida, sendo o meio de cultivo utilizado como branco. O método define uma unidade de atividade de emulsificação (UAE) como a quantidade de emulsificante que produzirá uma emulsão com absorbância de 1,0 em 540nm, ou seja, a quantidade de emulsificante capaz de elevar a absorbância do sistema em uma unidade. O mesmo método foi aplicado para determinação de atividades de

emulsificação de emulsões água-em-óleo de milho, água-em-óleo diesel e água-em-óleo de motor, substituindo o n-hexadecano por óleo de milho, óleo diesel ou óleo de motor.

#### Determinação do Índice de Emulsificação e da Estabilidade de Emulsão

Para determinar o índice de emulsificação, misturou-se 4 mL de n-hexadecano (óleo diesel, óleo de milho ou óleo de motor) com 4 mL de líquido metabólico livre de células em tubo com tampa, agitado em vórtex por 2 minutos, segundo método descrito por Cooper e Goldenberg (1987). O índice de emulsificação foi calculado em termos de porcentagem de emulsificação, definida como a razão entre a altura da emulsão em um determinado tempo e a altura total da coluna líquida, multiplicada por 100. Para determinar a estabilidade da emulsão, as soluções emulsificadas foram permitidas permanecer em repouso na temperatura ambiente e o índice de emulsificação foi calculado em diferentes intervalos de tempo (Kumar et al. 2006).

#### Determinação da Tensão Superficial

A tensão superficial foi determinada pelo método do anel de *Du Noy* utilizando um tensiômetro digital SIGMA 70 (KSV Instruments Ltd. Helsinki, Finland) na temperatura ambiente (25°C). A medida da tensão superficial (mN/m) foi realizada através do registro da força requerida para empurrar o anel de platina no líquido metabólico livre de células, através da interface ar-líquido.

#### Planejamentos Experimentais dos Meios de Produção

Para avaliar o potencial de produção de biossurfactante/bioemulsificante e de degradação de óleo diesel por *C.lipolytica* UCP 988, três planejamentos fatoriais (Box et al.

1978; Montgomery 1997) foram realizados, sequencialmente, visando entender os efeitos das concentrações da água do mar, do óleo diesel, da uréia, do sulfato de amônio, do fosfato monobásico de potássio e do pH inicial dos meios de cultivo sobre o crescimento celular, a atividade de emulsificação, a tensão superficial, o pH final e a salinidade. De acordo com os resultados dos planejamentos, os efeitos dos vários fatores sobre as variáveis respostas foram analisados e as melhores condições para produção de bioemulsificantes/biossurfactantes identificadas. Em todos os planejamentos, os experimentos foram realizados em ordem sorteada para evitar que erros atípicos fossem relacionados a determinadas combinações. As repetições no ponto central do planejamento foram realizadas para obtenção de estimativa da variabilidade em função do erro experimental e para permitir teste de adequação do modelo de primeira ordem. Nos três planejamentos realizados, Diagramas de Pareto - com nível de significância de 95 % - foram empregados para ilustrar as estimativas dos efeitos principais lineares e de segunda ordem, em valor absoluto, dos fatores em relação às variáveis respostas estudadas. No diagrama de Pareto, a magnitude de cada efeito é representada pelas colunas e a linha transversal às colunas corresponde ao valor de  $p$  igual a 0,05 e indica o quão grande deve ser o efeito para ter significado estatístico. O ponto no qual os efeitos estimados são significativos ( $p=0,05$ ) está indicado pela linha vertical vermelha. As significâncias dos efeitos foram testadas por análise de variância (ANOVA). As análises estatísticas dos planejamentos experimentais, incluindo os diagramas de Pareto foram realizadas usando o programa Statistica® versão 8.0 (Statsoft.Inc, Tulsa/OK,USA). Os demais gráficos foram contruídos com o apoio do programa SigmaPlot versão 10.0 (Systat software, Inc, Germany).

*Planejamento 1 - Avaliação dos efeitos das concentrações de óleo diesel e dos componentes do meio de produção sobre a atividade de emulsificação e a tensão superficial*

Planejamento fatorial completo  $2^4$ , constituído por 20 ensaios, incluindo 4 repetições no ponto central, foi realizado para verificar os efeitos e as interações das variáveis independentes, concentração do substrato (óleo diesel) e concentrações dos componentes do meio basal (uréia, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio), sobre as variáveis resposta tensão superficial e atividade de emulsificação dos filtrados dos líquidos metabólicos produzidos, após 168 horas de cultivo de *Candida lipolytica* em meios a base de água do mar. Os níveis e valores das variáveis independentes encontram-se especificados na Tabela 3 e basearam-se em valores empregados previamente em planejamento fatorial por Albuquerque (2006). O inóculo foi obtido a partir de um tubo de cultura pura de *C. lipolytica*, mantido à temperatura de 28 °C por 48 h. Para padronização do inóculo, células de levedura foram inoculadas em água do mar suplementada com uréia 0,4% (p/v) sulfato de amônio 1,1% (p/v) e fosfato monobásico de potássio 2,04% (p/v). Os componentes foram dissolvidos em 300 mL de água do mar, o pH foi ajustado para 5,3 e o meio foi esterilizado em autoclave a 120°C, por 20 minutos. O inóculo foi incubado a 28 °C e 150 rpm, durante 48 h. A concentração final do inóculo, determinada através de contagem em câmara de Neubauer foi de  $10^6$  células por mililitros. O inóculo foi utilizado na proporção de 5% nos meios de produção. Os componentes dos meios de produção foram pesados conforme especificações apresentadas na Tabela 3, dissolvidos em água do mar e esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. O pH inicial dos meios de produção foi ajustado em 5,3. Como substrato foi empregado óleo diesel a 1%(v/v), 3%(v/v) ou 5%(v/v), esterilizado em fator fluente e distribuído nos meios de produção, conforme especificações do planejamento fatorial completo  $2^4$  (Tabela 3). Os meios de produção foram incubados a 28°C e 150 rpm, em frascos Erlenmeyer de 500 mL, com volume útil de 300 mL, durante 168 horas.

*Planejamento 2 - Avaliação dos efeitos das concentrações da água do mar e dos componentes do meio de produção sobre a atividade de emulsificação e a tensão superficial*

Planejamento fatorial completo  $2^4$ , constituído por 20 ensaios incluindo 4 repetições no ponto central, foi realizado para investigar os efeitos e as interações das variáveis independentes, as concentrações de água do mar, de uréia, de sulfato de amônio e de fosfato monobásico de potássio sobre as variáveis resposta atividade de emulsificação e tensão superficial dos filtrados dos líquidos metabólicos produzidos por *Candida lipolytica* em diferentes meios de produção. Os níveis e valores das variáveis independentes são apresentados na Tabela 4. Três tipos de inóculos foram preparados a partir de tubos de cultura pura de *C. lipolytica* UCP 988, mantidos à temperatura de 28 °C por 48 h. Para o inóculo foram utilizados três erlenmeyers de 500 mL, cada um contendo 300 mL de meio líquido com composições especificadas na Tabela 5. Conforme o tipo do inóculo, os componentes foram dissolvidos em água destilada pura (0% de água do mar), em água do mar diluída (50% de água do mar) ou em água do mar pura (100% de água do mar). Os meios de crescimento dos inóculos tiveram os pH ajustados para 5,3 e foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Como fonte de carbono foi utilizado óleo diesel a 5% v/v, esterilizado em vapor fluente. Os inóculos foram incubados a 28 °C e 150 rpm, durante 48 h. A concentração final dos inóculos, determinada através de contagem em câmara de Neubauer, foi de  $10^6$  células por mililitros. O inóculo foi utilizado na proporção de 5% nos meios de produção. Os componentes dos meios de produção foram dissolvidos em água destilada (0% de água do mar), em água do mar diluída (50% de água do mar) ou em água do mar natural (100% de água do mar), de acordo com as especificações da Tabela 4 e esterilizados a 121°C por 20 minutos. O pH inicial dos meios foi ajustado em 5,3. Como fonte de carbono foi empregado óleo diesel a 5%(v/v). Os meios de produção foram incubados a 28°C e 150 rpm, em frascos Erlenmeyer de 500 mL, com volume útil de 300 mL, durante 168 horas.

### *Planejamento 3 - Avaliação dos efeitos do pH inicial e dos componentes do meio de produção sobre a atividade de emulsificação e a tensão superficial*

Planejamento fatorial completo  $2^3$ , constituído por 12 ensaios incluindo 4 repetições no ponto central, foi realizado para investigar os efeitos e as interações das variáveis independentes pH, concentração de sulfato de amônio e concentração de fosfato monobásico de potássio sobre as variáveis resposta atividade de emulsificação e tensão superficial dos filtrados dos líquidos metabólicos produzidos por *Candida lipolytica* em diferentes meios de produção. Para o inóculo, em um erlenmeyer de 1000 mL contendo 450 mL de água do mar estéril, foi preparada uma suspensão celular com concentração final de  $2 \times 10^6$  células por mililitros, determinada através de contagem em câmara de Neubauer. O inóculo foi utilizado diretamente, na proporção de 5%, nos meios de produção. Os componentes dos meios de produção foram dissolvidos em água do mar natural (100% de água do mar), de acordo com as especificações da Tabela 6 e esterilizados a 120°C por 20 minutos. O pH inicial dos meios foi ajustado conforme especificações apresentadas na tabela 9. Os meios de produção foram incubados a 28°C e 150 rpm, em frascos Erlenmeyer de 1000 mL, com volume útil de 750 mL, durante 120 horas. Como fonte de carbono foi empregado óleo diesel a 5%(v/v).

### *Ensaio de Biodegradação*

Para avaliar o potencial de degradação de óleo diesel por *C.lipolytica*, quatro ensaios foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 1000mL, com volume útil de 750 mL contendo: (1) água do mar suplementada com 1,0% (p/v) de sulfato de amônio e 1,0% (p/v) de fosfato monobásico de potássio e óleo diesel 5%(v/v); (2) água destilada suplementada com 1,0% (p/v) de sulfato de amônio e 1,0% (p/v) de fosfato monobásico de potássio e óleo diesel 5%(v/v); (3) água do mar suplementada com 1,0% (p/v) de sulfato de amônio e 1,0%

(p/v) de fosfato monobásico de potássio e óleo de milho 5%(v/v) e (4) água destilada suplementada com 1,0% (p/v) de sulfato de amônio e 1,0% (p/v) de fosfato monobásico de potássio e óleo milho 5%(v/v). O pH dos meios foi ajustado para 10. Os meios de crescimento e produção foram inoculados com suspensão celular de  $10^6$  e incubados a 28°C e 200rpm durante 120 horas. Perfis de crescimento, obtidos através de contagem de células viáveis, pelo método *pour plate*, e de pH, salinidade, tensão superficial e atividades de emulsificação foram construídos, nas quatro condições avaliadas, através de determinações realizadas a cada 24 horas, durante 4 dias. Perfis de estabilidade das emulsões formadas entre cultivos de 96 horas livres de células e óleo de milho e entre cultivos de 96 horas livres de células e óleo de motor foram determinados durante 168 horas, para cada uma das quatro condições avaliadas. Os parâmetros cinéticos de crescimento foram calculados segundo Pirt (1975).

#### Detecção Qualitativa de Tanase

A técnica por difusão em ágar de atividades enzimáticas fenoloxidasas foi realizada segundo Davidson, Campbell and Blaisdell (1938) na presença dos substratos ácido tânico e gálico que são oxidados por ação enzimática com formação de compostos de coloração acastanhada (amarronzada). Foram inoculados 150  $\mu$ L dos extratos metabólicos (sobrenadantes) em “poços” de 10 mm de diâmetro, perfurados assepticamente no meio de cultura contendo extrato de malte (15 g/L) e ágar (15 g/L), além dos respectivos substratos (5 g/L), sendo esses últimos esterilizados por filtração e adicionados no momento da distribuição do meio em placas de Petri. As amostras foram incubadas a 28 °C durante 7 dias. Os resultados foram avaliados pelas medidas dos diâmetros em centímetros dos halos de coloração amarronzada e expressos em função da intensidade do substrato oxidado.

### Determinações quantitativas de atividades enzimáticas

Os extratos metabólicos livres de células, obtidos por centrifugação a 5.500 rpm e filtração por membrana Millipore (0,45  $\mu\text{m}$ ), foram armazenados em triplicatas e congelados; durante a determinação das atividades, os líquidos metabólicos foram conservados em gelo. As atividades enzimáticas foram quantificadas espectrofotometricamente.

### Determinação enzimática de lacases

As lacases foram determinadas na presença do ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)). Esse substrato foi oxidado pelas lacases e o produto formado, avaliado segundo Kunamneni et al. (2008). O sistema de reação foi formado por 0,5 mL do líquido metabólico e 0,5 mL da solução de ABTS a 0,5 mM preparado em tampão acetato 0,1 M a pH 4,5. Paralelamente, foi determinada a atividade enzimática de uma amostra comercial de lacases de *Trametes versicolor* (Novoenzymes) sob as mesmas condições de trabalho. A reação enzimática foi acompanhada no espectrofotômetro (BIOCHROM – libra S32/S35) em 420 nm pelas leituras de absorbâncias do produto formado nos tempos de 0, 5, 10, 15 e 20 min. As velocidades máximas de cada reação foram calculadas pelas variações de absorbâncias nos tempos correspondentes. Uma Unidade Internacional (UI) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que catalizou um  $\mu\text{mol}$  de ABTS por minuto a pH 4,5 e 28 °C. Os cálculos de UI foram realizados em função do coeficiente de absorção molar do ABTS ( $36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### Determinação enzimática de tanases

As tanases foram quantificadas utilizando o ácido tânico como substrato que por hidrólise enzimática produziu ácido gálico e glicose segundo a metodologia descrita por Sharma, Agarwal e Saxena (2008). A solução de ácido tânico a 1% foi preparada em tampão fosfato-citrato 0,5 M a pH 5,0. O sistema de reação apresentou 0,5 mL do substrato, 0,5 mL da amostra e 1,0 mL do tampão e foi incubado sob agitação a 50°C por 30 min. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 2 mL de solução de albumina bovina sérica (BSA) a 2%. Um controle foi preparado contendo as soluções de substrato 0,5 mL, tampão 1,5 mL e BSA 2 mL. Após a incubação, os taninos foram precipitados durante 20 min a 28°C. As amostras foram centrifugadas a 5.500 rpm por 20 min e os sobrenadantes, filtrados por membrana de Millipore (0,45 µm). As amostras foram diluídas com água bidestilada e as absorbâncias do produto formado foram determinadas a 260 nm (BIOCHROM – libra S32/S35). A quantidade de ácido gálico produzido foi avaliada pela equação da reta correspondente à curva de calibração, construída a partir de soluções de ácido gálico na faixa de concentração de 0 a 10 µg/mL. Uma Unidade Internacional (UI) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um µmol de ácido gálico por minuto a pH 5,0 e 28 °C. As variações de absorbâncias do sistema de reação foram determinadas em triplicata e a média foi utilizada para calcular o teor de ácido gálico produzido no intervalo de 30 min. Os cálculos de UI foram realizados em função das velocidades máximas de reação no tempo correspondente.

## Determinação enzimática de lipases

As lipases foram determinadas na presença do substrato paranitrofenilpalmitato (pNPP) que por hidrólise produz o ácido palmítico e um derivado do paranitrofenil de coloração amarela (Vorderwulbecke et al. 1992).

O substrato foi dissolvido em isopropanol, utilizando banho-maria a 37 °C cuja solução foi armazenada em frasco âmbar e utilizada durante 10 dias a 4°C (solução A). Utilizando 2 g de triton X-100 e 0,5 g de goma arábica em 450 mL de tampão tris-HCl 50 mM a pH 8,0, foi preparada a solução B de estabilidade com 6 semanas a 4 °C.

A solução de ensaio foi a micro-emulsão preparada pela adição gota-a-gota de 1 mL da solução A a 9 mL da solução B sob agitação vigorosa. A solução final não deve apresentar turbidez; por apresentar pouco estabilidade, foi preparada imediatamente antes do ensaio (determinação de atividade) e utilizada enquanto não se apresentava amarelada.

O sistema de reação foi formado por 0,5 mL da emulsão, contendo o pNPP e 0,5 mL da amostra (líquido metabólico), adicionados à cubeta que foi selada com parafilme para facilitar a mistura. No branco, foi utilizada a solução tampão de tris-HCl 50 mM a pH 8,0 e a emulsão.

A reação foi acompanhada no espectrofotômetro (BIOCHROM – libra S32/S35) pelas absorbâncias em 410 nm do derivado colorido durante 20 min. Uma Unidade Internacional (UI) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que catalizou um  $\mu\text{mol}$  de pNPP por minuto a pH 8,0 e 28 °C. Os cálculos de UI foram realizados em função do coeficiente de absorção molar do pNPP ( $15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) para as velocidades máximas de cada reação, determinadas em função das variações de absorbâncias pelos tempos correspondentes. Sob essas condições de trabalho, foi determinada a atividade lipolítica de uma amostra comercial de lipases (lipolase da Novozymes).

## Resultados e Discussão

Biorremediação tem emergido como uma das mais importantes ferramentas para eliminar ou reduzir a contaminação causada por diversos compostos de origem antropogênica lançados no ambiente pelos derramamentos, sejam acidental ou deliberadamente (Dua et al. 2004). É sabido que a extensão da biodegradação pode ser limitada pela baixa disponibilidade de nitrogênio e fósforo e o desequilíbrio concomitante na relação C:N:P causado pelos altos níveis de carbono fornecido pelo derramamento de hidrocarbonetos (Aislabie et al. 2006). Estas condições reduzem a capacidade microbiana de produzir biomassa através da fonte de carbono contida no poluente, e freqüentemente ocorre em locais onde os níveis naturais de nitrogênio e fósforo são bastante baixos (Ruberto et al. 2008; Tamocai and Campbell 2002).

Os níveis naturais de nitrogênio e fósforo na água do mar são geralmente baixos. Em conseqüência para realizar um processo de biorremediação eficiente, quantidades apropriadas de fósforo e nitrogênio inorgânico devem ser aplicadas, para estimular o crescimento de microrganismos degradadores de diesel (Rolling et al. 2002). Em tratamentos biológicos, entretanto, é sempre necessário realizar testes de viabilidade para determinar o potencial microbiano para degradar poluentes e avaliar estratégias para otimizar as taxas de degradação antes do projeto em escala real ou tratamentos *in-situ* ou *ex-situ* (Mariano et al. 2007).

Bioemulsificantes, microrganismos e nutrientes na presença de oxigênio misturado pelas correntes marítimas facilitam a dispersão e degradação eficaz de óleos poluentes. O bioemulsificante torna efetiva a emulsificação óleo-em-água, facilitando a entrada de microrganismos utilizadores de hidrocarbonetos na camada de óleo. Estes microrganismos, através de suas enzimas, vinculadas à membrana, degradam os hidrocarbonetos e liberam dióxido de carbono e água, além de produzirem biomassa microbiana. Adicionalmente, os outros metabólitos primários e secundários, incluindo biossurfactantes e bioemulsificantes,

ajudam a sustentar a emulsificação e dispersão de óleo nos dias subseqüentes (Pavitrán, 2006). Portanto, neste trabalho empregou-se a suplementação da água do mar com nutrientes essenciais, tais como nitrogênio e fósforo, para facilitar o crescimento microbiano e a produção e disponibilidade contínua de enzimas degradativas e biossurfactantes.

Biodegradabilidade e baixo impacto ambiental são algumas das vantagens dos biossurfactantes comparadas com surfactantes quimicamente sintetizados. Entretanto, os custos de produção, separação e concentração dos biossurfactantes continuam sendo os fatores limitantes, que inviabilizam sua produção em larga escala (Crosman et al., 2002). Portanto, para que a indústria petroquímica deixe de ser um mercado potencial e torne-se um mercado real para produção de bioemulsificantes/biossurfactantes é necessário que os mesmos possam ser produzidos em meios de baixo custo e aplicados com mínima especificação de pureza (Desai and Banat 1997), de forma que a preparação bruta (cultivo ou líquido metabólico livre de células) possa ser usada na limpeza de locais contaminados por hidrocarbonetos e para recuperação aumentada de óleo (Sadouk et al. 2008). Considerando tais fatos, este trabalho empregou água do mar suplementada com nitrogênio e fósforo, como meio baixo custo, visando produzir líquidos metabólicos com propriedades emulsificantes e surfactantes, capazes de serem usados na sua forma bruta na biorremediação de ambientes marinhos impactado por óleo diesel.

#### *Planejamentos Experimentais dos Meios de Produção*

Os resultados obtidos em três planejamentos realizados, em escala de frascos, para avaliar o potencial de produção de biossurfactante/bioemulsificante e de degradação de óleo diesel por *C.lipolytica* UCP 988 em água do mar suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo são apresentados e discutidos a seguir.

### *Planejamento Experimental 1*

Os filtrados dos cultivos com 168h, provenientes dos 20 experimentos do planejamento fatorial não foram capazes de emulsificar o n-hexadecano, mas foram capazes de emulsificar diferentes óleos vegetais, em especial o óleo de milho. Resultados de atividade de emulsificação para emulsões água-em óleo de milho, de tensão superficial, de pH e de salinidade, obtidos em cada um dos 20 ensaios do planejamento, após 168 horas de cultivo, são apresentados na Tabela 7.

Efeitos das concentrações de óleo diesel e dos componentes do meio de produção sobre a atividade de emulsificação

Apesar do fosfato monobásico de potássio, isoladamente, não ter apresentado efeito estatisticamente significativo sobre a atividade de emulsificação, suas interações tanto com o diesel quanto com a uréia, nesta ordem, apresentaram efeitos altamente significativos, do ponto de vista estatístico, para o aumento da atividade de emulsificação dos meios de produção avaliados (Figura 1). A interação entre o sulfato de amônio e o fosfato monobásico de potássio também apresentou um efeito positivo, embora não significativo estatisticamente, sobre o aumento da atividade de emulsificação. As interações da uréia com o sulfato de amônio, do diesel com a uréia e do diesel com o fosfato monobásico de amônia apresentaram efeitos negativos, estatisticamente não significativos, sobre o aumento da atividade de emulsificação. Os aumentos das concentrações de uréia, de sulfato de amônio, de fosfato monobásico de potássio e de diesel produziram efeitos negativos, mas sem significância estatística, sobre o aumento da atividade de emulsificação.

O efeito da curvatura foi estatisticamente significativo. Teste de curvatura foi realizado e revelou falta de ajuste da aproximação linear. A Figura 1 mostra que a curvatura cruza o nível de confiança de 95%, indicando a proximidade do ponto ótimo e a necessidade

de planejamento de segunda ordem e de modelo quadrático que incorpore o efeito da curvatura.

Efeitos das concentrações de óleo diesel e dos componentes do meio de produção sobre a tensão superficial

Os aumentos das concentrações de uréia, sulfato de amônia, fosfato monobásico de potássio e diesel, do nível inferior para o nível superior do planejamento, assim como as interações entre os mesmos, não exerceram efeitos estatisticamente significativos, sobre a tensão superficial dos filtrados livres de células com 168h de cultivo (Figura 2). O efeito da curvatura também não foi significativo.

Identificação dos melhores meios para produção de bioemulsificantes/biossurfactantes

A adição de fontes de nitrogênio e fósforo à água do mar mostrou um efeito significativo e sinérgico sobre a estimulação da biodegradação de óleo diesel por *C.lipolytica*. A levedura *C.lipolytica* UCP 988 foi capaz de utilizar óleo diesel (1%, 3% ou 5% v/v) como substrato e crescer efetivamente em água do mar natural suplementada com uréia, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio. De uma forma geral, nos 20 experimentos realizados (Tabela 7), a atividade de emulsificação apresentou valores, variando entre 5,454 e 6 UAE e tensão superficial variando entre 43,48 e 53,61 mN/m, não sendo identificada correlação entre altos valores de atividade de emulsificação e baixos valores de tensão superficial. Os valores de pH dos cultivos com 168 h livres de células variaram entre 4,92 e 6,08 (meio ácido) e as salinidade entre 42‰ e 65‰. Entre os 20 ensaios realizados, o ensaio 1 - composto por uréia (0,10%), sulfato de amônio (0,10%) e fosfato monobásico de potássio (0,68 %) – e o ensaio 5 - composto por uréia (0,10 %), sulfato de amônio (1,10 %) e fosfato monobásico de potássio (0,68%) - apresentaram a maior atividade de

emulsificação (6UAE), mas apresentaram tensões superficiais respectivamente iguais a 49,22 e 52,55 mN/m. Ambos usaram como substrato 1% de óleo diesel, apresentaram pH ácido, próximo ao pH inicial dos meios (5,3) e salinidade superior a 45 ppt. O ensaio 1 apresentou pH igual a 5,14 e salinidade igual a 46 ppt. O ensaio 5 apresentou pH igual a 5,44 e salinidade igual a 53‰. Os ensaios 17, 18, 19 e 20 - repetições do ponto central do planejamento: diesel (3,0%), uréia (0,25%), sulfato de amônio (0,60%) e fosfato monobásico de potássio (1,36 %) - apresentaram atividade de emulsificação de  $5,96 \pm 0,07$  UAE, tensão superficial de  $49,15 \pm 1,96$  mN/m, pH de  $5,46 \pm 0,16$  e salinidade de  $48,25 \pm 2,5$ ‰. O ensaio 4 - composto por diesel (5%v/v), uréia (0,40%p/v), sulfato de amônio (0,1%p/v) e fosfato de potássio (0,68%p/v) - apresentou a menor tensão superficial (43,48 mN/m), atividade de emulsificação igual a 5,784 UAE, pH 5,65 e salinidade igual a 50‰. Os meios de produção (1 e 5) que apresentaram maior atividade de emulsificação (6 UAE), usaram 1 % de óleo diesel (menor concentração), enquanto o meio que apresentou menor tensão superficial (43,48 mN/m) usou 5% de óleo diesel (maior concentração). Nestes experimentos, altos valores de emulsificação não foram correlacionados com baixos valores de tensão superficial.

A redução da tensão superficial é frequentemente utilizada como um critério primário para selecionar microrganismos produtores de biossurfactantes, embora agentes emulsificantes e dispersantes não possuam, necessariamente, habilidade de reduzir a tensão superficial (Youssef 2004). O bioemulsificante extracelular liposan de *Candida lipolytica*, por exemplo, não é capaz de reduzir a tensão superficial da água (72,8 mN/m) embora emulsifique e estabilize efetivamente emulsão água-em-óleo (Cirigliano and Carman 1985). Por outro lado, apesar dos soforolipídeos de *Torulopsis bombicola* terem mostrado capacidade de reduzir tensão superficial, eles não demonstraram ser bons emulsificantes (Cooper and Paddock 1984). O líquido metabólico livre de células de *C.lipolytica* UCP 988 demonstrou ser um excelente emulsificante e um promissor biossurfactante, haja vista que a

tensão superficial do meio 4, após a autoclavagem, foi igual a 60,25 mN/m e portanto sua redução após 5 dias para 47,44 mN/m foi estatisticamente significativa, principalmente ao se considerar a grande influência exercida pela salinidade (48‰) e pelo pH (9,72) sobre a tensão superficial do meio. Existem vários exemplos de biossurfactantes que tanto baixam a tensão quanto estabilizam emulsões (Albuquerque 2006, Singer et al. 1985; Rapp et al., 1979).

*Candida tropicalis* crescida em cultura com batelada alimentada usando água destilada como solvente do meio mineral e n-hexadecano como única fonte de carbono produziu um emulsificante extracelular. O emulsificante mostrou atividade contra vários hidrocarbonetos, máxima com aromáticos e mínima com parafinas. Altas atividades de emulsificação foram obtidas em condições com nitrogênio limitado que em condições com substrato limitado. Nas condições do experimento, as tensões superficiais variaram de 49 a 52 mN/m. Considerando que a tensão superficial do meio de cultura foi igual a 68 mN/m, a redução da tensão superficial do meio não foi significativa. Isto implica que o material excretado pela célula foi um melhor emulsificante que um biossurfactante (Singh and Desai 1989; Singh et al. 1990). Durante crescimento, em meio mineral a base de água destilada, tendo combustível de avião como única fonte de carbono, *Cladosporium resinae*, conhecido como fungo do querosene, por ser frequentemente isolado em tanques de aeronaves, produziu um biossurfactante extracelular, denominado Cladosan, que após 25 dias reduziu a tensão da fase aquosa de 72 mN/m para 50 mN/m e que depois de purificado parcialmente reduziu a tensão para 40 mN/m. (Muriel et al. 1996)

Para avaliar a produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* LBI, Piróllo (2006) usou um meio mineral composto por (g/L): NaNO<sub>3</sub> 4; KCl 0,1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,0; CaCl<sub>2</sub> 0,01; Mg SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 10,5 ; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e extrato de levedura 0,1; e 0,05mL/L de solução de elementos traços contendo boro, cobre, manganês, molibidênio e zinco. O pH inicial do meio foi ajustado para 6,8. Como fonte de carbono utilizou-se diesel a 0; 4; 1,0; 2,0; 5,0; 10; 20 e 30% (v/v). Os ensaios foram inoculados com 5% de suspensão de

*P.aeruginosa* LBI e incubados a 30° C e 200rpm durante 168 horas. As tensões iniciais dos meios encontravam-se em uma faixa entre 50 mN/m e 60mN/m e após o cultivo foram reduzidas para uma faixa entre 45 e 35 mN/m. A tensão do cultivo crescido com 5% de diesel caiu para aproximadamente 30mN/m.

Plaza et al. (2006) realizaram estudos com dezesseis espécies de bactérias isoladas de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo para produção de biossurfactantes/bioemulsificantes em cultura líquida, contendo petróleo bruto em condição termofílicas. Os resultados obtidos mostraram que embora a redução da tensão superficial tenha sido uma boa medida da produção de biossurfactante, ela não apresentou correlação com a atividade de emulsificação.

Investigando o crescimento de *Staphylococcus hominis*, *Kocuria palustris* e *Pseudomonas aeruginosa* LBI, em meio mineral, usando óleo diesel envelhecido como substrato de baixo custo e monitorando a produção de biossurfactante através de determinações da tensão superficial, Mariano et al. (2008) obtiveram resultados que demonstraram que nenhuma diminuição significativa na tensão superficial foi verificada em qualquer dos experimentos realizados. Na análise dos resultados obtidos, os autores adotaram o critério usado por Habba et al. (2000) que considera como bons produtores de biossurfactantes aqueles que diminuem a tensão para 40mN/m ou menos. Assim nenhuma produção de biossurfactante foi obtida nos experimentos. Em outros trabalhos, a *P. aeruginosa* LBI foi capaz de produzir o biossurfactante ramnolipídeo usando resíduo do refino de óleo de soja bruto (Moraes et al. 2002), manitol, glicerol, querosene, óleo diesel, óleo cru e lodo oleoso (Piróllo 2006).

De acordo com o critério usado por Habbas et al. (2000), descrito anteriormente, a levedura *C.lipolytica* não seria uma boa produtora de biossurfactantes, apesar de se mostrar uma boa produtora de emulsificantes quando crescida sobre óleo diesel em água do mar suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo em todas as condições do planejamento realizado.

Entretanto de acordo com Frielo et al. (2001), uma grande variedade de fatores metabólicos e fisiológicos é requerida para degradação de diferentes compostos no óleo diesel. Mas como todas estas propriedades não são encontradas em um único organismo, a melhor solução geralmente é o uso de um consórcio de microrganismos, já que monoculturas podem ser adversamente afetadas por interações negativas. Através da seleção de um consórcio de um ambiente contaminado, as interações negativas tendem ser minimizadas, pois os microrganismos tenderão a se adaptar mais rapidamente ao ambiente contaminado (Frielo et al. 2001).

Em estudo com solos contaminados por óleo diesel, realizado por Bento et al (2005), o melhor efeito de abaixamento de tensão superficial foi observado quando isolados bacterianos foram misturados. Um consórcio de isolados de amostra de solo de Long Beach reduziu a tensão superficial para 41,4 mN/m e aumentou o índice de emulsificação por 64% depois de 24 horas.

Portanto, comparados aos resultados obtidos por Bento et al (2005) usando um consórcio bacteriano e com os outros resultados discutidos anteriormente usando monoculturas, os resultados de redução de tensão obtidos isoladamente por *C.lipolytica* nas condições dos ensaios 4, 7, 15 e 2 deste planejamento, podem ser considerados promissores. É importante ressaltar que até a presente data, não foram encontrados, na literatura consultada, relatos sobre produção de bioemulsificante e/ou biosurfactante associada, ou não, a degradação de óleo diesel por *C.lipolytica* em água do mar natural, suplementada como fontes de nitrogênio e fósforo.

### *Planejamento experimental 2*

Os resultados do planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> realizado para investigar os efeitos e interações das concentrações de água do mar, uréia, sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio sobre a atividade de emulsificação e a tensão superficial de

filtrados de cultivos de *Candida lipolytica*, com 168 horas, livre de células estão apresentados na Tabela 8.

Efeitos da concentração da água do mar e dos componentes do meio de produção sobre a atividade de emulsificação

O aumento da concentração de uréia e o aumento da concentração de sulfato de amônio apresentaram efeitos positivos estatisticamente significativos para o aumento da atividade de emulsificação (Figura 3). Por outro lado o aumento da concentração de fosfato de monobásico de potássio e o aumento da concentração de água do mar (uso de água do mar não diluída) nos meios de produção apresentaram efeitos negativos estatisticamente significativos para o aumento da atividade de emulsificação, ou seja, não favoreceram o aumento da atividade de emulsificação. As interações entre sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio, entre a água do mar e o sulfato de amônio e entre a uréia e o fosfato monobásico de potássio apresentaram efeitos positivos significativos para o aumento da atividade de emulsificação. A interação entre a água do mar e o fosfato monobásico de potássio apresentou um efeito negativo que, embora não tenha cruzado, alcançou o limite inferior da significância estatística. A interação entre a uréia e o sulfato de amônio apresentou efeito negativo significativo para o aumento da atividade de emulsificação. A interação da água do mar com a uréia não apresentou efeito significativo sobre o aumento da atividade de emulsificação. O efeito da curvatura foi estatisticamente significativo.

Efeitos da concentração da água do mar e dos componentes do meio de produção sobre a tensão superficial

Apenas o aumento da concentração de fosfato de potássio apresentou um pequeno efeito negativo, mas com significância estatística, sobre o aumento da tensão superficial, ou

seja, favoreceu a redução da tensão superficial (Figura 4). A interação entre a uréia e o sulfato de amônio também apresentou um pequeno efeito negativo, mas sem significância estatística, sobre o aumento a tensão superficial. As demais interações e fatores estudados, também não apresentaram efeitos significativos sobre a tensão superficial dos filtrados dos líquidos metabólicos produzidos por *Candida lipolytica* nos meios de produção estudados. O efeito da curvatura também não foi estatisticamente significativo.

#### Identificação dos melhores meios para produção de bioemulsificantes/biossurfactantes

Os líquidos metabólicos dos cultivos com 168h, foram capazes de emulsificar óleo de milho, óleo diesel e hexadecano. Altas atividades de emulsificação (variando entre 5,37 e 6,00 UAE) foram obtidas para emulsões água-em óleo de milho em todas as 20 condições do planejamento (Tabela 8). Apenas, na condição do ponto central (água do mar diluída a 50%, uréia 0,25% v/v, sulfato de amônio 0,4 % v/v e fosfato monobásico de potássio 1% v/v), houve formação de emulsões água-em-hexadecano e água-em óleo diesel, contudo a estabilidade das mesmas foi baixa (inferior a 24 horas). No ponto central, as emulsões água-em-hexadecano e as emulsões água em óleo-diesel apresentaram atividade de emulsificação de  $4,32 \pm 0,25$  UAE e  $3,60 \pm 0,24$  UAE, respectivamente.

Entre todas as condições analisadas, as condições 13 e 15, foram as que apresentaram filtrados dos cultivos com 168 h, com menores tensões superficiais, 42,35 mN/m e 42,22 mN/m, respectivamente. Ambas usaram água destilada e as mesmas concentrações de sulfato de amônio (0,6% v/v) e fosfato monobásico de potássio (1,5 %v/v), diferindo apenas quanto à presença (0,5% v/v) ou ausência de uréia. As atividades de emulsificações apresentadas nestas duas condições também foram elevadas: 5,91 UAE e 6,00 UAE, respectivamente.

Entre os ensaios do planejamento que usaram água do mar pura, o ensaio 8 (uréia 0,5% v/v, sulfato de amônio 0,6% v/v e fosfato monobásico de potássio 0,5 %v/v) e o ensaio

10 (uréia 0% v/v, sulfato de amônio 0,2% v/v e fosfato monobásico de potássio 0,5 %v/v) foram os que apresentaram líquidos metabólicos com 168 horas, livres de células, com as menores tensões superficiais: 46,67 mN/m e 43,76 mN/m, respectivamente. A tensão superficial do filtrado do cultivo com 168 horas do meio 10 (43,76mN/m) - que usou como solvente apenas água do mar natural e como fonte de carbono apenas óleo diesel – foi comparável a dos meios 13 (42,35 mN/m) e 15 (42,22 mN/m) que usaram como solvente apenas água destilada. Portanto, neste planejamento, o meio 10 é o que apresenta maior interesse biotecnológico, do ponto de vista de produção de surfactante com alta atividade de emulsificação por *C. lipolytica* em água do mar natural, utilizando óleo diesel como única fonte de carbono.

Outros trabalhos sobre produção de emulsificantes por *C. lipolytica* UCP 988, empregando água do mar diluída a 50%, mas usando como fonte de carbono, óleo de milho (Vance-Harrop et al. 1999; Vance-Harrop 2000; Albuquerque et al. 2006) e óleo de babaçu (Vance-Harrop et al, 2003), também investigaram a influência da uréia, do sulfato de amônia e do fosfato monobásico de potássio sobre a atividade de emulsificação. Vance-Harrop (2000) obteve uma atividade de emulsificação para emulsão água-em-n-hexadecano de 2,555 UAE para cultura de *C. lipolytica* IA 1055 crescida em meio contendo 0,1 % (p/v) de uréia; 0,1 % (p/v) de sulfato de amônia; 0,68 % (p/v) de fosfato de potássio, 5 % (v/v) de óleo de milho, 50%(v/v) de água destilada e 50% (p/v) de água do mar. Albuquerque e colaboradores (2006) obtiveram atividade de emulsificação para emulsão água-em-n-hexadecano de 4,415 UAE e tensão superficial de 32,750 mN/m em meio de produção otimizado contendo 0,544 % (p/v) de uréia; 2,131% (p/v) de sulfato de amônia; 2,628 % (p/v) de fosfato de potássio, 5% (v/v) de óleo de milho, 50 %(v/v) de água destilada e 50 % (v/v) de água do mar. Atividade de emulsificação para emulsão água-em-n-hexadecano de 5,46 UAE e tensão superficial de 33 mN/m foram obtidas por Albuquerque (2006) com 120 horas de produção, em biorreator de 5 litros com volume útil de 4 litros, com temperatura controlada em 28°C , velocidade de agitação de 150 rpm e aeração de 1vvm, contendo

0,544 % (p/v) de uréia; 2,131 % (p/v) de sulfato de amônia; 2,628(p/v) de fosfato de potássio.

A levedura *Yarrowia lipolytica* (NCIM 3589), estágio perfeito da *C. lipolytica*, produziu um emulsificante durante a fase estacionária quando crescia em um meio de água do mar artificial contendo 1% (v/v) de n-hexadecano como única fonte de carbono. A composição da água do mar artificial foi: NaCl, 24.53g ; KBr, 0.1 g ; NaF, 0.003 g ; KCl, 0.7 g ; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 1.54 g ; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.03 g ; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4.09 g ; NaHCO<sub>3</sub>, 0.2 g ; SrCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0.017 g ; e MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 11.1 g, em 1 litro de água deionizada. O meio continha 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.001% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 1% n-hexadecane em pH 8.1. As células do meio do pré-inóculo foram centrifugadas e lavadas com o meio de crescimento estéril. A suspensão de células contendo aproximadamente 10<sup>9</sup> cells ml<sup>-1</sup> foi adicionada no meio supracitado e incubada por 7 dias em 30° C e 200 rpm. O emulsificante foi isolada por ultra-filtração e continha 5% de proteína, 20% de carboidrato e 75% de lipídeo. O emulsificante produzido por *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 foi capaz de emulsificar emulsões óleo-em-água com hidrocarbonetos aromáticos tais como tolueno, xileno, benzeno e 1-metil-naftaleno. Com óleo cru e n-alcanos as gotas dispersaram em duas fases e, portanto a emulsão não foi estável. O emulsificante foi estável para um intervalo de pH de 2 a 10, havendo perda considerável de atividade de emulsificação para valores de pH superiores a 10 (Zinjarde et al. 2003).

A absorção e a utilização de substratos insolúveis em água, tais como alcanos de petróleo em óleo cru, requer adaptações fisiológicas específicas dos microrganismos. Síntese de moléculas anfífilas específicas, i.e., biosurfactantes, tem freqüentemente sido tomadas como um pré-requisito ou para mecanismos de adesão específicos do microrganismo a gotas de óleo ou para emulsificação do óleo, seguida por absorção de gotas de óleo submicroscópicas. Várias bactérias têm sido observadas desenvolver diferentes estratégias para tratar com substratos insolúveis em água, tais como hidrocarbonetos (Rosenberg et al. 1999). Assim, para facilitar a absorção de hidrocarbonetos através da membrana externa hidrofílica, muitos microrganismos

utilizadores de óleo produzem agentes de superfície ativa extra-celular ou associado a parede celular (Halfeburt et al. 1986). Isto inclui tanto compostos de baixo peso molecular quanto ácidos graxos, triacilgliceróis e fosfolípidos, como também glicolípidos mais pesados, exemplos nos quais se incluem o emulsan e o liposan (Cirigliano and Carman 1984).

O filtrado parcialmente purificado de células de cultura de *C. lipolytica*, suplementada com hexadecano (conhecido também como liposan) foi capaz de produzir emulsões estáveis, do tipo água-em-óleo, com vários hidrocarbonetos (Cirigliano and Carman 1984) e também com óleos vegetais comerciais (Cirigliano and Carman 1985). Entretanto, quando dissolvido em solução aquosa com concentrações variando de 0,002 a 0,2% (p/v), o liposan parcialmente purificado não reduziu significativamente a tensão superficial da água, em qualquer das concentrações examinadas. A solução 0,2% foi rotineiramente usada nos ensaios de emulsificação.

Como no primeiro planejamento realizado, neste segundo planejamento também não foi evidenciada a existência de correlação entre altos valores de atividade de emulsificação e baixos valores de tensão superficial dos líquidos metabólicos dos cultivos com 168 horas livres de células de *C. lipolytica*. Por outro lado, os resultados obtidos no ponto central do planejamento sugerem que o uso de água do mar diluída a 50% como solvente dos meios de produção, além de favorecer a atividade de emulsificação de emulsões água em-óleo de milho, também favoreceu a atividade de emulsificação de emulsões água-em-n-hexadecano e emulsões água-em-óleo diesel.

### *Planejamento experimental 3*

Os resultados do planejamento fatorial completo  $2^3$  - realizado para investigar os efeitos e interações do pH e das concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio sobre a atividade de emulsificação e a tensão superficial de filtrados de cultivos

de *C. lipolytica* crescida, durante 120 horas, em água do mar, tendo o óleo diesel a 5% como única fonte de carbono - estão apresentados na Tabela 9. Os valores dos fatores, nos níveis inferior e superior deste terceiro planejamento, basearam-se na composição do ensaio 10 e nos resultados sugeridos pelo planejamento anterior. Portanto, a uréia foi eliminada, e a única fonte de carbono utilizada neste planejamento foi o óleo diesel.

*Efeitos do pH inicial e das concentrações dos componentes do meio de produção sobre a atividade de emulsificação*

Isoladamente, nenhum dos 3 fatores estudados, pH, concentração de sulfato de amônio e concentração de fosfato de potássio apresentou efeito significativo sobre o aumento da atividade de emulsificação, quando variaram de seus níveis inferiores para seus níveis superiores, de acordo com as especificações do planejamento (Figura 5). Apenas a interação do pH como sulfato de amônio apresentou um efeito negativo, estatisticamente significativo, sobre o aumento da atividade de emulsificação. As demais interações entre os fatores não exerceram influências significativas, do ponto de vista estatístico, sobre o aumento da atividade de emulsificação.

*Efeitos do pH inicial e das concentrações dos componentes do meio de produção sobre a tensão superficial*

As variações do pH e das concentrações de sulfato de amônio e de fosfato monobásico de potássio e a interação entre os mesmos, produziram, embora sem significância estatística, efeitos negativos sobre o aumento da tensão superficial dos cultivos com 120 h, livres de células (Figura 6). O efeito da curvatura também não foi estatisticamente significativo.

*Efeitos do pH inicial e das concentrações dos componentes do meio de produção sobre a concentração celular com 120 horas de cultivo*

A mudança do pH inicial dos meios de produção de 4 para 10 foi o fator que mais favoreceu o aumento da concentração celular nos meios de cultivo do terceiro planejamento, ou seja, a mudança do pH inicial de ácido para básico foi o fator que produziu efeito positivo, com maior significância estatística, para a degradação de óleo diesel por *C.lipolytica* em água do mar natural, suplementada com sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio (Figura 7). O aumento da concentração de sulfato de amônio de 0% para 1% (p/V) também produziu um efeito positivo altamente significativo, do ponto de vista estatístico, sobre o aumento da concentração celular e conseqüentemente sobre o aumento da degradação de óleo diesel por *C.lipolytica*. A interação do pH com o sulfato de amônio também favoreceu com significância estatística o aumento da concentração celular e conseqüentemente da degradação de óleo diesel por *C.lipolytica*. O aumento da concentração de fosfato monobásico de potássio 1,0% para 2,0% (p/v) produziu um efeito negativo sobre o aumento da concentração celular e conseqüentemente sobre a degradação de diesel por *C.lipolytica*. Este resultado indica, por outro lado, que a concentração de fosfato monobásico de potássio deve ser mantida em seu nível inferior, isto é, 1,0% (p/V) para favorecer a degradação de óleo diesel por *C.lipolytica*. A interação do pH com o fosfato monobásico de potássio e a interação do sulfato de amônio com o fosfato de potássio também produziram efeitos negativos (provavelmente devido ao nível superior de fosfato monobásico de potássio adotado neste planejamento) muito significativos do ponto de vista estatístico. O efeito da curvatura também foi negativo e estatisticamente muito significativo. O diagrama de Pareto ilustrado na Figura 7 mostra que a curvatura cruza o nível de confiança de 95%, indicando a proximidade do ponto ótimo e a necessidade de planejamento de segunda ordem e de modelo quadrático que incorpore o efeito da curvatura.

### *Efeitos do pH inicial e das concentrações dos componentes do meio de produção sobre o pH final*

A mudança do pH inicial dos meios de 4 (ácido) para 10 (alcalino) e o aumento das concentrações de sulfato de amônio e de fosfato monobásico de potássio favoreceram com significância estatística o aumento do pH final dos meios de cultivos, conforme pode-se constatar no diagrama de Pareto ilustrado na Figura 8. Com exceção da interação entre o sulfato de amônio e o fosfato monobásico de potássio, as demais interações também contribuíram com significância estatística para o aumento do pH final dos meios. O pH inicial dos meios e a interação entre o pH e o sulfato de amônio, nesta ordem, foram os fatores que mais contribuíram para o aumento do pH final dos meios de cultivo. Meios de produção com pH básico, conforme foi visto anteriormente, favoreceram o crescimento celular e conseqüentemente a degradação de óleo diesel por *C. lipolytica*. O efeito da curvatura foi positivo e estatisticamente significativo.

### *Efeitos do pH inicial e das concentrações dos componentes do meio de produção sobre a salinidade*

Culturas de *Candida lipolytica* crescidas em água do mar suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo, com pH inicial ajustado para 4, 7 e 10 foram capazes de tolerar salinidades superiores a 4% e inferiores ou iguais a 6,5 %, 5,1% e 4,8%, respectivamente; demonstrando potencial para descontaminação de ambientes marinhos contaminados com óleo diesel.

Os aumentos das concentrações de sulfato de amônio e de fosfato de potássio foram os fatores que mais contribuíram para o aumento da salinidade dos meios de cultivo (Figura 9). A mudança do pH inicial dos meios de cultivos de pH 4 (ácido) para pH 10 (alcalino) desfavoreceu, o aumento das salinidades dos meios de cultivo, contribuindo com isto para o

aumento da concentração celular e conseqüentemente para a biodegradação de óleo. A interação entre o pH e o sulfato de amônio e a interação entre o sulfato de amônio e o fosfato monobásico de potássio também desfavoreceram o aumento da salinidade. Apenas a interação do pH com o fosfato monobásico de potássio não produziu efeito estatisticamente significativo. O efeito da curvatura foi negativo e estatisticamente significativo, indicando a necessidade de planejamento de segunda ordem e de modelo quadrático que incorpore o efeito da curvatura.

*Identificação dos melhores meios para produção de bioemulsificantes/biossurfactantes e degradação de óleo diesel por C. lipolytica*

Os líquidos metabólicos dos cultivos com 120 h, não emulsificaram n-hexadecano, mas foram capazes de emulsificar óleo de milho e outros óleos vegetais como soja e canola através de largos intervalos de salinidade (entre 40 e 60‰) e pH (entre 3,8 e 9,72). Altas atividades de emulsificação (entre 5,26 e 6,00 UAE) foram obtidas para emulsões água-em óleo de milho em todas as 12 condições do planejamento (Tabela 9). As tensões superficiais dos cultivos com 120 horas livres de células variaram entre 41,29 mN/m e 55,83 mN/m., demonstrando mais uma vez que, altos valores de atividade de emulsificação não estão necessariamente correlacionados com baixos valores de tensão superficial.

Os cultivos de 120 horas, livres de células de *C.lipolytica*, obtidos a partir dos meios de produção 2, 4, 6 e 8 - realizados com pH inicial igual a 10 - apresentaram as menores tensões superficiais do planejamento e altos valores de emulsificação. O meio de produção 8 - composto por 1,0% (p/v) de sulfato de amônio e 2,0% (p/v) de fosfato monobásico de potássio - apresentou após 120 horas de cultivo, a menor tensão superficial (41,29 mN/m) de todos os três planejamentos realizados, atividade de emulsificação igual a 5,526 UAE, pH 9,59, salinidade de 51‰.

Os cultivos de 120 horas livres de células do meio de produção 2 (composto por 1,0% p/v de fosfato monobásico de potássio) e do meio de produção 6 (composto por 2,0% p/v de fosfato monobásico de potássio) apresentaram a maior atividade de emulsificação do planejamento (6UAE) e tensões superficiais iguais a 48,47 mN/m e 46,79 mN/m, respectivamente. O cultivo de 120 horas livre de células do meio de produção 2 apresentou pH de 7,95 e salinidade de 40‰, enquanto o do meio de produção 6 apresentou pH de 9,18 e salinidade de 50‰.

O meio de produção 4 - composto por 1,0% (p/v) de sulfato de amônio e 1,0% (p/v) de fosfato monobásico de potássio - apresentou filtrado do cultivo de 120 horas com tensão superficial de 47,44 mN/m, atividade de emulsificação igual a 5,746 UAE, pH 9,72 e salinidade de 48‰. Entre todos os cultivos de 120 horas o que apresentou maior degradação de óleo diesel foi o do meio de produção 4. A concentração celular do meio 4 foi de  $6 \times 10^6$  células/mL.

Os meios 2 e 6 apresentaram concentração celular de  $2 \times 10^2$  células/mL, enquanto o meio 8 apresentou concentração celular de  $3 \times 10^3$  células/mL. Após 120 horas de cultivo, os meios de produção com pH inicial ácido apresentaram atividades de emulsificação superiores a 5,8 UAE, tensões superficiais superiores a 50 mN/m e concentrações celulares de  $1 \times 10^2$  células/mL. Os ensaios 9, 10, 11 e 12, realizados no ponto central do planejamento (pH 7, com 0,5% p/v de sulfato de amônio e 1,5% p/v de fosfato monobásico de potássio) apresentaram cultivos com 120 horas com atividade de emulsificação de  $5,929 \pm 0,08$  UAE, tensão superficial de  $52,28 \pm 3,34$  mN/m, pH de  $6,67 \pm 0,05$ , salinidade de  $47,25 \pm 0,5$ ‰ e concentração celular de  $1,5 \times 10^2 \pm 57,54$  células/mL.

Os resultados obtidos mostram a habilidade da levedura *Candida lipolytica* produzir bioemulsificante/biossurfactantes quando crescida em condições de alta salinidade (água do mar suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo, com salinidade variando de 42‰ a 61‰, ou seja, de 4,2 a 6,1%) e pH extremos (pH 4, pH 7 e pH 10) usando óleo diesel a

5%(v/v) como única fonte de carbono. Cloreto de sódio é o maior componente da água do mar e freqüentemente quebra a emulsão entre óleo e água do mar (Jung et al. 1995).

A importância do pH para o crescimento de *C.lipolytica* em água do mar natural, suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo, tendo óleo diesel como única fonte de carbono, foi constatada neste planejamento (Tabela 9) e pode ser observada na Figura 10. O crescimento celular e a degradação de diesel no meio de produção 4 (Figura 10 b), que teve o pH inicial ajustado para 10 são visivelmente superiores ao dos meios de produção 2 (Figura 10 a) e 6 (Figura 10 c), com pH iniciais ajustados para 4 e 7, respectivamente.

Para verificar a reprodutibilidade do ensaio 4 do terceiro planejamento, um novo experimento foi realizado, em triplicata, nas mesmas condições, apresentando atividade de emulsificação para emulsões água-em óleo de milho de  $5,72 \pm 0,19$  UAE, tensão superficial  $45,76 \pm 1,38$  mN/m, pH  $9,5 \pm 0,03$  e salinidade de  $46,6 \pm 0,51$  e concentração celular de  $1 \times 10^6$  células/mL. Resultados que não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ) dos obtidos no ensaio 4 do terceiro planejamento, comprovando assim a reprodutibilidade do experimento e a capacidade de *C.lipolytica* degradar diesel em água do mar e produzir bioemulsificante e biosurfactante. A biodegradação de diesel por *C. lipolytica* obtida em uma das três repetições do ensaio 4, em relação a um ensaio controle realizado nas mesmas condições sem a presença do microrganismo, pode ser observada na Figura 11.

Não foram encontrados, na literatura consultada, relatos de crescimento de *C. lipolytica* ou outras leveduras em água do mar natural, suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo, usando óleo diesel como única fonte de carbono. Entretanto existem diversos relatos de crescimento de outros microrganismos sobre óleo diesel em outros meios de cultura. Quando diesel foi usado por *Pseudomonas aeruginosa* LBI como substrato para crescimento em meio mineral rico em nutrientes (Piróllo 2006), a biomassa aumentou em todos os experimentos demonstrando a capacidade do microrganismo degradar este hidrocarboneto. Biomassas mais altas foram obtidas depois de 48 horas de fermentação em

óleo diesel a 20%. Produção de biossurfactante foi medida como ramnolipideos no meio de cultura. Nos experimentos com 0,4-5% de óleo diesel, pouco biossurfactante foi detectado.

Os efeitos do pH sobre a atividade de emulsificação do extrato não purificado do biossurfactante produzido por *Miroydes sp.* SM1 para petróleo bruto envelhecido foram investigados por Maneerat e Dikit (2007). Precipitação do extrato bruto ocorreu em pH abaixo de 5, mas nenhuma mudança na atividade foi obtida no intervalo de pH variando de 5 a 12. Em pH próximo ao ponto isoelétrico, não existe repulsão eletrostática entre as moléculas vizinhas e os compostos tendem a coalescer e precipitar (Milewski 2001). O biossurfactante KP2 (surfactin) de *Bacillus sp.* KP2 retém sua atividade em pH variando de 6 a 10 e exibe atividade ótima em pH igual a 6 (Roongsawang et al. 1999).

Existem poucos estudos publicados que tratam com os efeitos da salinidade sobre a degradação microbiana de hidrocarbonetos. Shiaris (1989) relatou que uma correlação geralmente positiva entre salinidade e taxa de mineralização de fenantreno e naftaleno em sedimentos estuarinos. Kerr and Capone (1988) observaram a relação entre taxa de mineralização de naftaleno e salinidade em sedimentos de rio Hudson que foi dependente do regime de salinidade do ambiente, com locais estuarinos exibindo uma falta de inibição de mineralização sobre um grande intervalo de salinidades, que foi o caso para o lugar com menos correntes salinas. Em um estudo de evaporação de areia de sais hipersalinos, Ward e Brock (1978) mostraram que as taxas de metabolismos de hidrocarbonetos diminuíram com o aumento da salinidade no intervalo de 3,3 a 28,4% e atribuíram os resultados a redução geral nas taxas metabólicas microbianas (Leahy and Colwell 1990).

Estudos detalhados sobre a estabilidade dos bioemulsificantes produzidos em relação à salinidade estão sendo realizados visando seu uso em ambientes marinhos e indústrias biotecnológicas. Abdel-Mawgoud et al. (2008) estudaram os efeitos da salinidade sobre a atividade de emulsificação de biossurfactantes para investigar sua aplicabilidade em biorremediação de poluição marinha. Foi encontrado que a atividade superficial de teste de

ramolipídeos não foi afetada em qualquer grau por altas salinidades, ainda quando as salinidades alcançaram 6%, praticamente o dobro da salinidade da água do mar.

Embora não esteja claro como a salinidade afeta a mineralização de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), postula-se que ela afete as interações partícula-HAPs e também a solubilidade dos HAPs (Ashok et al. 1995).

### *Ensaio de Biodegradação*

Independente do substrato (óleo diesel ou óleo de milho) e do solvente (água do mar ou água destilada) empregados houve crescimento de *C.lipolytica* (Figura 12) nas quatro condições avaliadas: (1) água do mar suplementada com 1,0% (p/v) de sulfato de amônio e 1,0% (p/v) de fosfato monobásico de potássio e óleo diesel 5%(v/v); (2) água destilada suplementada com 1,0% (p/v) de sulfato de amônio e 1,0% (p/v) de fosfato monobásico de potássio e óleo diesel 5%(v/v); (3) água do mar suplementada com 1,0% (p/v) de sulfato de amônio e 1,0% (p/v) de fosfato monobásico de potássio e óleo de milho 5%(v/v) e (4) água destilada suplementada com 1,0% (p/v) de sulfato de amônio e 1,0% (p/v) de fosfato monobásico de potássio e óleo milho 5%(v/v). Os perfis de crescimento, pH, salinidade, atividade de emulsificação e tensão superficial monitorados durante 96 horas, nas quatro condições avaliadas são apresentados e discutidos a seguir (Figuras 13 e 14). Perfis de estabilidade das emulsões formadas entre cultivos de 96 h, livres de células e óleo de milho e entre cultivos de 96 h, livres de células e óleo de motor, determinados durante 168 horas também são apresentados (Figura 15) e discutidos a seguir.

*Perfis de crescimento celular, pH, salinidade e produção de biomulsificante/biossurfactante*Condição 1

Quando cultivada sob condições adversas, em água do mar suplementada com sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio, usando óleo diesel a 5 % (v/v) como única fonte de carbono (condição 1), a levedura *C.lipolytica* apresentou uma curva de crescimento com fase de adaptação de aproximadamente 24 horas e taxa de decaimento celular de  $-0,17 \text{ h}^{-1}$  (Figura 13 a) devido à metabolização de compostos tóxicos do diesel. Após esta fase de adaptação, *C. lipolytica* metabolizou os compostos presentes no óleo diesel, na presença da água do mar, com uma velocidade de crescimento celular máxima ( $\mu_{\text{max}}$ ) de  $0,11 \text{ h}^{-1}$  e tempo de geração ( $t_g$ ) de 6,4 h, atingindo a biomassa final de  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Durante a fase de adaptação da levedura a salinidade aumentou de 45‰ para 46‰, decrescendo para 44‰ durante a fase de crescimento e mantendo essa salinidade até o final do cultivo. O pH apresentou variações insignificantes em torno de 9,5. A tensão superficial aumentou de 41,9 mN/m no início do cultivo para 49,4 mN/m, decrescendo para 46,6 mN/m nas 24 horas restantes. As atividades de emulsificação para emulsões água-em-óleo de motor apresentaram o valor de 6 UAE durante todo o cultivo, enquanto que as atividades de emulsificação para emulsões água-em-óleo de milho apresentaram valores um pouco menores até 72 horas, diminuindo para 5,4 UAE nas últimas 24 horas de cultivo (Figura 13 b). Esses resultados comprovaram a capacidade de *C.lipolytica* crescer sobre óleo diesel como única fonte de carbono em meio alcalino (pH 9,5) com salinidade variando entre 44 e 47‰.

O líquido metabólico do cultivo de 96 horas livre de células de leveduras apresentou atividades de emulsificação para emulsões água-em-óleo de milho e emulsões água-em-óleo de motor de respectivamente, 5,49 e 6,00 UAE, tensão superficial de 46,63 mN/m, pH de 9,47 e salinidade de 44‰. O líquido metabólico do cultivo de 120 horas livres de células

crescidas nas condições do ensaio 4 do terceiro planejamento (pH 10 e concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio iguais a 1% (p/v)) apresentou atividades de emulsificação para emulsões água-em-óleo de milho de 5,746 UAE, tensão superficial de 47,44 mN/m, pH 9,72 de e salinidade de 48 ‰. As diferenças entre esses resultados foram provenientes dos diferentes tempos de cultivo (96 e 120 h) e velocidades de agitação (150 e 200 rpm), mas não foram estatisticamente significativas, e ratificaram a capacidade da levedura *C. lipolytica* crescer em água do mar suplementada com 1,0% (p/v) de sulfato de amônio e 1,0% (p/v) de fosfato monobásico de potássio usando óleo diesel como única fonte de carbono e ainda produzir emulsificantes /biossurfactantes.

### Condição 2

Os componentes da água do mar (metais) exerceram um papel importante em nível fisiológico da *C. lipolytica*, porque não houve crescimento celular quando essa levedura foi cultivada em óleo diesel como única fonte de carbono na presença de água destilada (condição 2). O número de células inicial decresceu da ordem de  $10^6$  a  $10^3$  UFC/mL nas primeiras 24 h de cultivo (taxa de decaimento celular de  $-0,29 \text{ h}^{-1}$ ), devido provavelmente à intoxicação das células pelos compostos fenólicos presentes no óleo diesel (Figura 13 c). As células de *C. lipolytica* continuaram a se reproduzir, mas o número de células viáveis foi igual ao número de células não viáveis, permanecendo constante ( $10^3$  UFC/mL) numa fase estacionária de crescimento celular até 72 h de cultivo com uma tendência de um decaimento celular no fim do experimento (96 h de cultivo). O decaimento celular, nas primeiras 24 horas de cultivo, foi acompanhado pela diminuição da tensão superficial de 40,54 para 39,03 mN/m e da salinidade de 18 para 16‰. Entretanto, quando a levedura entrou na fase estacionária de crescimento, a salinidade aumentou para 19‰, permanecendo neste valor até o fim do experimento e a tensão continuou caindo até atingir o valor mínimo de 37,8 mN/m. Com relação à condição 1, a salinidade foi reduzida em mais de 50%. O pH permaneceu alcalino durante todo o experimento, variando de 9,7 para 9,1

(Figura 13 d). As atividades de emulsificação para emulsões óleo-de-motor-em-água apresentaram valor de 6 UAE durante todo o experimento. As atividades de emulsificação para emulsões água-em-óleo-de-milho oscilaram em torno de 5,4 UAE. Esses resultados sugerem que a ausência dos sais minerais (presentes na água do mar) desfavoreceu o crescimento da levedura e a degradação de diesel em água destilada suplementada com sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio. Por outro lado, a diminuição da salinidade favoreceu a redução da tensão superficial da água destilada suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo, contendo óleo diesel como única fonte de carbono da levedura.

### Condição 3

Os dados cinéticos do crescimento da levedura *C. lipolytica*, quando cultivada em óleo de milho e água do mar (condição 3), não foram determinados experimentalmente devido à formação de *pellets* esbranquiçadas nas primeiras 24 h de cultivo, cuja quantidade aumentou proporcionalmente durante o experimento. Apesar da baixa resistência dessas *pellets*, a condição de agitação a 200 rpm durante 96 h não causou destruição e sim, favoreceu a formação de maior quantidade das mesmas.

Nas primeiras 24 h de cultivo, a tensão superficial apresentou um pequeno decréscimo, variando de 37,8 para 37,2 mN/m, mas nas 48 h seguintes atingiu o valor máximo de 45,93 mN/m, decrescendo para 43,82 mN/m no fim do cultivo (Figura 13 a). Nessa condição, a salinidade apresentou um valor constante de 44 ‰ por 48 h, tempo após o qual começou a aumentar até atingir o valor de 46 ‰ no final do experimento. Durante o crescimento celular, houve um processo de acidificação do meio, com o pH decrescendo de 9,1 para 6,2 (Figura 13 b). Atividades de emulsificação de 6 UAE foram obtidas para emulsões água-em-óleo de motor e valores um pouco mais baixos, em torno de 5,9 UAE, foram obtidos para emulsões água-em-óleo de milho.

Os resultados sugeriram que o mecanismo de peletização foi promovido por mudanças na permeabilidade da parede celular. Mas a falta de informação na literatura sobre pelotização de levedura na presença de óleo de milho em água do mar, não permitiu comparação direta dos dados obtidos. A utilização de um meio de cultura contendo sulfato de amônio como fonte de nitrogênio levou à formação de *pellets* de *Penicillium chrysogenum*, ao passo que a utilização de água de maceração de milho levou a um crescimento na forma filamentosa (Pirt and Callow 1959). O estudo do efeito de nutrientes na formação de *pellets* de *Rhizopus arrizhus*, mostrou que baixas concentrações de peptona no meio de cultura conduziram à formação de *pellets* e altas concentrações produziram um crescimento na forma filamentosa (Byrne and Ward 1989).

#### Condição 4

A *C. lipolytica* cultivada em água destilada e utilizando como única fonte de carbono, óleo de milho a 5 % (p/v) apresentou taxa de crescimento máxima ( $\mu_{\max}$ ) de  $0,21 \text{ h}^{-1}$  e tempo de geração de 3,3 h (condição 4). Sob essa condição, a curva de crescimento da levedura apresentou as quatro principais fases (Figura 14 c). A lag fase ocorreu durante as primeiras 24 h do cultivo. No início, as células adaptaram-se às condições de crescimento, considerando que o inóculo do cultivo foi 5 % (v/v) de uma suspensão obtida a partir de um tubo de cultura pura, contendo  $10^6$  células/mL. Em seguida, o crescimento da levedura foi de natureza exponencial durante 24 a 48 h; depois a cultura atingiu a fase estacionária com formação de biomassa na ordem de  $10^9$  UFC/mL no intervalo de tempo de 48 a 72 h. A fase de declínio do crescimento foi observada nas últimas 24 h do cultivo, isto é, durante 72 a 96 h quando foi determinada uma taxa de morte de  $-0,11 \text{ h}^{-1}$ . A tensão superficial do meio de cultivo foi reduzida de 40,91 para 26,01 mN/m. A salinidade do meio permaneceu constante e igual a 19 ‰ durante as primeiras 72 h de cultivo, baixando para 16 ‰ no fim do experimento. Assim como na condição 3, houve acidificação do meio, com o pH passando

de 9,2 para 6,1 durante o crescimento de *C. lipolytica* em água destilada, suplementada com sulfato de amônio e fosfato de potássio, tendo óleo de milho como única fonte de carbono (Figura 14 d). As atividades para emulsões óleo-de-motor-em-água apresentaram valor de 6 UAE, das primeiras horas até o final do experimento. As atividades de emulsificação para emulsões água-em-óleo-de-milho apresentaram comportamento similar, mas a partir de 48 h a atividade passou a decrescer até atingir 5,54 UAE no fim do cultivo. Esses resultados indicaram que em condições favoráveis, com salinidade variando entre 16 e 19 ‰ e tendo óleo de milho como substrato. *Candida lipolytica* UCP 988 produziu surfactante(s) capaz(es) de reduzir a tensão do meio de cultivo para 26 mN/m e emulsificante(s) capaz(es) de apresentar atividades de emulsificação para emulsões óleo de motor-em-água e água-em-óleo de milho superiores a 5,5 UAE.

Comparando o tempo de geração 6,4 h, calculado na presença do óleo diesel e água do mar (condição 1) com o valor de 3,3 h, calculado na presença de óleo de milho e água destilada (condição 4), ficou comprovado um crescimento mais lento sob condição adversa. Embora, a biomassa final tenha sido mil vezes menor na condição 1 (diesel e água do mar), esses resultados onde ficam comprovados que *C. lipolytica* metabolizou componentes do diesel na água do mar, aliados à produção de surfactante por essa levedura, incentivarão futuras investigações científicas para aplicação dessa levedura em processo de biorremediação de derramamento de petróleo no mar.

A análise dos resultados obtidos nas condições dos quatro ensaios realizados sugeriu que: (a) a suplementação da água do mar com fontes de nitrogênio e fósforo, em proporções adequadas, estimulou a degradação do óleo diesel (única fonte de carbono) por *C. lipolytica* e também a produção de bioemulsificantes/biossurfactantes; (b) o crescimento e o pH estão correlacionados: durante a degradação de óleo diesel há produção de hidróxidos que mantêm alcalino o pH dos meios (condição 1 e 2) e durante a degradação do óleo de milho há produção de ácidos que abaixam o pH dos meios (condições 2 e 4) (c) a salinidade e a tensão estão correlacionadas: nos ensaios com água do mar (condições 1 e

4) quando a salinidade aumentou a tensão superficial também aumentou e nos ensaios com água destilada (condições 2 e 4) quando a salinidade diminuiu a tensão também diminuiu; (d) a alta salinidade da água do mar e o pH alcalino contribuíram para a degradação de óleo diesel por *C.lipolytica* UCP 988 no ensaio realizado na condição 1; (e) a baixa salinidade da água destilada e o pH ácido favoreceram a degradação de óleo milho e a produção de biossurfactante no ensaio realizado na condição 4 (f) os emulsificantes produzidos apresentaram altas atividades de emulsificação, independentemente das condições de salinidade e pH; (g) altas atividades de emulsificação não apresentaram relação com baixos valores de tensão superficial.

#### *Perfis de estabilidade de emulsões formadas com óleo de milho e com óleo de motor*

As habilidades dos líquidos metabólicos dos cultivos com 96 h formarem emulsões estáveis com n-hexadecano, óleo diesel, óleo de milho e óleo de motor foram avaliadas nas quatro condições investigadas (Figura 15). O índice (volume) de emulsificação variou para os diferentes substratos hidrofóbicos usados. Considerando a especificidade do(s) bioemulsificante(s)/biossurfactante(s) produzido(s) nos líquidos metabólicos dos cultivos com 96 horas, o óleo de motor e o óleo de milho, nesta ordem, foram os melhores substratos. O óleo diesel e o n-hexadecano não formaram emulsões estáveis. Outros óleos vegetais e compostos alifáticos e aromáticos não foram testados.

Os índices de emulsificação e as estabilidades das emulsões, do tipo óleo-em-água, formadas entre os líquidos metabólicos dos cultivos de 96 horas (provenientes das quatro condições avaliadas) e o óleo de motor foram superiores as emulsões, do tipo água-em-óleo, formadas entre os líquidos metabólicos dos cultivos de 96 horas (provenientes das quatro condições avaliadas) e o óleo de milho. Os líquidos metabólicos provenientes de cultivos de *C.lipolytica* crescida sobre o óleo diesel em água do mar (condição 1) ou água destilada (condição 2) formaram emulsões mais estáveis com o óleo (de milho ou de motor)

do que os líquidos metabólicos provenientes de cultivos de *C.lipolytica* crescida sobre o óleo milho em água do mar (condição 3) ou água destilada (condição 4).

As emulsões formadas entre os líquidos metabólicos livre de células e o óleo de motor, apresentaram decrescentemente a seguinte ordem de índice de emulsificação e estabilidade (IEE): IEE condição 1 > IEE condição 2 > IEE condição 4 > IEE condição 3. As emulsões formadas entre os líquidos metabólicos livre de células e o óleo de milho, apresentaram decrescentemente a seguinte ordem de IEE: IEE condição 1 > IEE condição 2 > IEE condição 4 > IEE condição 3.

O óleo de motor formou emulsões estáveis apresentando índices de emulsificação iguais a 100 % com 0 horas e superiores a 70 % após 168 h. O óleo de milho formou emulsões com líquidos metabólicos das condições 3, 4 e 2 que apresentaram índices de emulsificação superiores a 80 % com 0 horas e que decaíram para 0 % com 24, 48 e 72 horas, respectivamente. A emulsão formada entre o líquido metabólico proveniente da condição 1 e óleo de milho apesar de ter apresentado índice de emulsificação igual 54,54 % com 0 horas, a partir de 24 e até 72 h, apresentou índices de emulsificação superiores ou igual aos das emulsões formadas entre os líquidos metabólicos provenientes das outras condições e óleo de milho, apresentando, portanto um comportamento mais estável.

#### *Detecção Qualitativa de Tanases*

Testes de detecção de tanase usando amostras de cultivos livres de células de *C.lipolytica* foram realizados, conforme Davidson, Campbell e Blasdel (1938), para as quatro condições estudadas: (C1) água do mar + óleo diesel ; (C2) água destilada + óleo diesel; (C3) água do mar + óleo de milho e (C4) água destilada + óleo de milho. Apenas na condição C2 houve confirmação positiva do teste (Figura 16), observada através de uma zona de coloração marron escuro ao redor dos discos contendo ácido tânico. O diâmetro médio dos halos foi igual a 3,16 cm no primeiro dia do teste e do segundo ao quinto dia

igual a 3,5 cm. Placas sem ácido tânico e ácido gálico também foram usadas como controle negativo.

### *Determinações Quantitativas de Atividades Enzimáticas*

#### *I - Determinação enzimática de lacases*

A produção de lacases por *C. lipolytica* cultivada sob diferentes condições nutritivas está ilustrada na Figura 17. Na presença de compostos fenólicos presentes no diesel, a produção de lacases por essa levedura atingiu 0,11 e 0,14 UI/L, utilizando água do mar e água destilada respectivamente. A variação entre essas atividades enzimáticas na ordem de  $10^{-2}$  indicou que os metais não influenciaram de forma significativa a produção dessas enzimas utilizando o diesel.

Por outro lado, a presença de metais pode interferir a atividade das lacases. A estrutura dessas enzimas contém quatro átomos de cobre ligados ao centro ativo. O cobre desempenha funções estruturais e funcionais na molécula da enzima, apresentando diferentes propriedades físicas e químicas. A adição de cobre no cultivo de fungos filamentosos aumenta a atividade de lacases quando está presente na faixa de 0,0004 a 1,2 uM, enquanto em concentrações elevadas causa inibição enzimática. A presença de outros metais pesados também aumenta a atividade de lacases: Zn a 0,006 - 18 uM e Cd a 1 - 5 mM enquanto os metais Ag, Hg, Pb e Zn à concentração de 1 mM diminuem a velocidade catalítica dessas enzimas (Baldrian 2003).

Embora o diesel não tenha induzido a produção da lacase por *C. lipolytica* neste trabalho, Peralta et al. (2004) ressaltaram a indução de lacases por *Pleurotus pulmonarius* na presença de compostos fenólicos. Esses autores observaram que a atividade dessa enzima no cultivo controle foi 10 U/mg de biomassa seca cujo valor aumentou para 200

U/mg de biomassa seca após 24 h da adição de vanilina a 0,25 mM ao cultivo do fungo filamentoso. Os resultados de lacases, determinados neste trabalho em U/mL, não foram considerados significativamente diferentes sob o ponto de vista estatístico, já que são diferenciados entre si apenas na quarta casa decimal (0,0001 e 0,0002 U/mL).

Os cultivos da *C. lipolytica* na presença de óleo de milho (condições C3 e C4) apresentaram diferentes valores de lacases dependendo do meio líquido. A maior produção dessas oxidases foi determinada na presença de água do mar, utilizando o óleo de milho como fonte de carbono, atingindo o valor máximo de 0,21 UI/L. Nessas condições de cultivos pode ter ocorrido a formação de mediadores devido à presença de componentes de lignina oriundos do milho que aumentaram a atividade catalítica das lacases.

A especificidade das lacases não está totalmente elucidada. Essas fenoloxidases também oxidam compostos não fenólicos, desde que estejam na presença de mediadores. Essas substâncias são sintéticas ou produtos metabólicos de baixo peso molecular que por ação das lacases, liberam elétrons e na forma oxidada, atuam de maneira intermediária, oxidando os compostos. Os mediadores ampliam a capacidade oxidativa das lacases por viabilizar a ação enzimática sobre uma grande variedade de substratos (Silva e Gomes 2004).

Essas enzimas têm sido produzidas por fungos cultivados em meio líquido após o consumo de fontes de carbono e de nitrogênio. As lacases participam da degradação da lignina, inativando por polimerização os compostos fenólicos que são tóxicos aos microrganismos (Peralta et al. 2004). Por outro lado, enzimas lignolíticas, utilizando óleo de milho como fonte de carbono foram produzidas por Gottschalk et al. (1999 apud Bon, Ferrara e Corvo 2008).

Não foi encontrado na literatura, valores de produção de lacases por leveduras utilizando compostos fenólicos ou óleo de milho, cultivados em meio básico. A literatura ressalta valores elevados de atividade lacases determinados na faixa de 15 a 30 dias de cultivo de diferentes fungos filamentosos cultivados em meio ácido; *Coriolus versicolor* foi

cultivado na presença de resíduo de tomate, sulfato de amônio e sais minerais a pH 5,5 com produção máxima de 362 U/L com 5 dias de cultivo (Freixo et al. 2008); *Trametes versicolor* foi cultivado em biorreator na presença de glicose como fonte de carbono e em pH 3,0 e 5,0 com produção máxima de 1.500 U/L com 15 dias (Rancano et al. 2003); *Lentinula edodes* foi cultivado durante 30 dias e a atividade máxima determinada foi 251.000 U/L, utilizando glicose, tartarato de amônio, sais minerais e compostos indutores a pH 5,0 (Cavallazzi et al. 2005).

## II - Determinação enzimática de tanases

A produção de tanase por *C. lipolytica* foi independente da fonte de carbono utilizada nos cultivos submersos a pH 10, 28°C e 200 rpm (Figura 18). A máxima produção dessa atividade enzimática que atingiu 1,1 UI/mL foi determinada na presença de diesel e de água destilada com 48 e 72 h de crescimento. A atividade enzimática foi inibida cerca de 86 %, utilizando esse mesmo substrato na presença de água do mar. A diversidade de metais presentes na água do mar (tabela) pode inibir a atividade enzimática devido esses cátions alterarem a conformação espacial da enzima ativa. Segundo Battestin, Matsuda e Macedo (2004), dentre as propriedades da tanase, foi ressaltada sua inibição por  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  e, inativação por o-fenantrolina, EDTA, 2-mercaptoetanol, tioglicolato de sódio, sulfatos e cloretos de magnésio e cálcio.

Em contraste, a produção de tanase por *C. lipolytica* cultivada na presença de óleo de milho foi independente da presença de metais da água do mar. Foi determinado atividade tanásica nos valores de 0,21 e 0,25 UI/mL com 48 h de cultivo, utilizando água do mar e água destilada, respectivamente. Esse substrato, oriundo de um vegetal pode conter resíduos que interferiram metabolicamente na levedura em estudo (Aguilar e Gutierrez-Sanchez 2001).

A produção de tanase tem sido amplamente investigada por espécies de *Aspergillus* e de *Bacillus*. Dependendo da cepa e das condições de cultivo a enzima é induzida e expressa com diferentes níveis de atividade. Compostos fenólicos como: ácido gálico e ácido tânico induzem a síntese desta enzima, cujo mecanismo não tem sido demonstrado claramente além das controvérsias do papel de taninos hidrolisados na síntese da tanase (Aguilar et al. 2007).

Em comparação aos resultados obtidos nos cultivos de *C. lipolytica*, a literatura apresenta diferentes culturas de *Aspergillus niger* com produção extracelular de atividade tanásica de 1,03 U/mL e 537 U/mL com 48 e 24 h de cultivo, respectivamente, na presença de ácido tânico em cultivos submersos (Aguilar et al. 2002; Cruz-Hernandez et al. 2006). Esses autores determinaram o efeito da concentração de ácido tânico na produção de tanases. A variação desse substrato de 12,5 a 50 g/L, aumentou a atividade enzimática. Cruz-Hernandez et al. (2006) determinaram uma redução de 40 % na síntese de tanase quando foi utilizado 100 g/L de ácido tânico.

O valor elevado de atividade tanásica obtido no cultivo submerso de *A. niger* na presença de 50 g de ácido tânico e de sulfato de amônio foi quatro vezes maior quando esse fungo filamentoso foi cultivado em processo estacionário. Paralelamente, essas atividades enzimáticas não foram determinadas com 30 h de cultivo devido à presença de proteases (Cruz-Hernandez et al., 2006). Aguilar et al. (2002) também confirmaram a presença de atividades proteolíticas em cultivos submersos de uma diferente cultura de *A. niger* investigada na produção de tanase.

Foi também reportado na literatura, o efeito repressor da atividade de tanases pelos açúcares: glicose, lactose e sacarose em concentrações acima de 1 g/L em cultivos de *Bacillus licheniformis*. A máxima produção de tanase 0,2 U/mL foi obtida na presença de ácido tânico a 1 % e glicose a % durante o crescimento desse bacilo no intervalo de 18 a 21 h, na fase estacionária de crescimento celular, a pH 5,0 e 30 C (Mondal et al. 2000) .

Battestin e Mechedo (2007) confirmaram a repressão metabólica por surfactantes na produção de tanase em cultivos de *Paecilomyces variotti*, utilizando resíduo de café e farelo de trigo a pH 5,7 e 30 C. A produção máxima no cultivo controle dessa enzima atingiu 0,4 U/mL e foi obtida com 5 dias de cultivo enquanto a adição de Tween-20, Tween-80 e Triton X-100 a % em cultivos independentes, diminuiu as atividades enzimáticas 34, 30 e 13 % respectivamente.

A fisiologia de microrganismos também foi investigada visando à produção de tanases por *Candida* sp. (Aoki et al. 1976).

### III - Determinação enzimática de lipases

A produção de lipases por *C. lipolytica* foi determinada apenas nos cultivos submersos cujo substrato foi o óleo de milho, independente do diluente investigado e com 72 e 96 h de crescimento celular. Os valores de atividades lipolíticas determinados na presença da água do mar foram 0,4 e 0,5 UI/L enquanto na presença de água destilada, atingiram aproximadamente o dobro, 0,8 e 0,9 UI/L.

Os valores determinados de atividades lipolíticas produzidas por *C. lipolytica* neste trabalho foram bem menores que os valores da literatura, considerando que a levedura foi cultivada em meio alcalino (pH 10) cuja condição é adversa ao seu cultivo. Por outro aspecto, não foi objeto neste estudo, atingir produtividades competitivas de produção de enzimas as quais podem ser obtidas pela investigação da fisiologia microbiana por otimização de processo biotecnológico, além de ser utilizada cultura de microrganismo modificada geneticamente.

Peters and Nelson (1951) iniciaram as pesquisas de fisiologia das células de *C. lipolytica*, visando ao aumento da atividade das lipases. Esses autores investigaram a produção dessas enzimas pela *Candida* na presença de diferentes vitaminas. Esses componentes nutricionais quando combinados em várias concentrações induziram a

produção de lipases em diferentes níveis de atividade. A maior atividade lipolítica foi determinada no meio de cultivo contendo glicose, sulfato de amônio e outros sais minerais, adicionado de cloreto de tiamina na concentração de 200 µg/L.

Valores de atividade lipolítica elevados, atingindo 36,8 e 38,8 U/mL foram obtidos por Ionitã et al. (2001) após otimização do cultivo de *C. lipolytica* na presença de glicose, água residuária da maceração do milho (corn steep liquor), extrato de levedura, Tween-80, sais minerais e antiespumante. A produção de lipases foi investigada em um fermentador contendo 6 L do meio de cultivo, a 27 °C, durante 20 – 24 h. Foram determinadas as atividades lipolíticas sob diferentes velocidades de agitação (400 a 900 rpm) e em condições de aeração de 2 a 4 L/min. A máxima atividade foi determinada no início da fase estacionária de crescimento celular (20 a 22 h), sob agitação de 900 rpm e aeração de 4 L/min. Com relação à variação do pH na produção de enzimas, o pH foi 4,5 – 5,0 no início dos experimentos, diminuindo até 3,5 durante 8 – 10 h de cultivo para em seguida, aumentar até 5,2 – 5,4 quando a taxa de biossíntese de lipases foi elevada.

As lipases têm sido produzidas também por mutante de *Yarrowia lipolytica* em cultivo submerso em frasco de Erlenmeyer na presença de glicose, extrato de levedura, peptona e sais minerais. Foi confirmado que a triptona estimulou a atividade específica cujo valor médio atingiu 241,6 U/mg, dependendo do tipo e quantidade de peptídeos presentes nesse nutriente. Foram isolados os peptídeos que induziram a produção de lipases e determinada suas composições químicas dos aminoácidos (Turki et al. 2009).

Neste trabalho, as lipases não foram produzidas por *C. lipolytica* quando o substrato foi o óleo diesel, nem utilizando a água destilada, nem a água do mar nos cultivos submersos na presença de fontes de nitrogênio e de fósforo. A literatura apresenta trabalhos investigando a relação entre lipases e poluentes orgânicos. Em solos contaminados com óleo diesel, Riffaldi et al. (2006) determinaram a diminuição de atividades lipolíticas quando esses solos foram submetidos à biorremediação.

Margesin et al. (1999) propuseram uma monitorização da biorremediação de solos contaminados por diesel em função do comportamento de atividades lipolíticas. O número de microrganismos degradadores de diesel e as atividades das lipases foram correlacionados com o residual de hidrocarbonetos do solo cuja concentração diminuiu enquanto a atividade enzimática e o número de microrganismos aumentaram com o tempo, independente da fertilização das amostras de solo. Esses autores propuseram que os sistemas enzimáticos para degradação de lipídeos são similares aos envolvidos na degradação de diesel e que a adição de nutrientes aumenta a atividade metabólica e a biomassa microbiana capazes de degradar tanto os hidrocarbonetos como os lipídeos.

Margesin and Schinner (1997) investigaram a variação do número de células microbianas e da atividade lipolítica em amostras de solos contaminados por óleo diesel numa área glacial com temperatura média de 7 °C e altitude cerca de 3000 m acima do nível do mar. Em três anos consecutivos de investigação, foi determinada uma remoção crescente do óleo diesel para um número de microrganismos heterotróficos na faixa de  $10^7$  a  $10^8$  UFC/g de solo enquanto as atividades das lipases diminuíram com o tempo, em ambas amostras de solo, bioestimuladas ou não. A presença dos fertilizantes favoreceu o aumento das contagens microbianas apenas no primeiro ano. Esses autores determinaram um número de microrganismos heterotróficos degradadores de óleo diesel na ordem de  $10^6$  UFC/g de solo.

Margesin et al. (2007) monitoraram a atividade lipolítica, durante a biorremediação de solos contaminados por óleo diesel nas concentrações de 2500 a 20.000 mg/Kg de solo. Nos tratamentos dos solos contaminados por bioestimulação com fertilizantes, a atividade das lipases aumentou nas amostras cujas concentrações de óleo diesel foram menores do que 20.000 mg/Kg solo. Paralelamente, a degradação dos TPH foi quatro vezes maior quando comparado com as amostras de solo não fertilizadas. A remoção máxima dos TPH atingiu 80 % para a maior concentração de óleo diesel, 20.000 mg/Kg solo, em 38 dias de biorremediação. As lipases foram utilizadas como indicador biológico durante os

experimentos. Após atingir a atividade máxima, essa atividade diminuiu quando foram adicionadas às amostras de solo, concentrações menores que 5000 mg TPH/Kg de solo enquanto permaneceram aproximadamente constante na presença de concentrações elevadas de óleo diesel. Não foram determinadas variações significativas nas atividades das lipases durante a biorremediação dos solos não contaminados.

Para concluir convém ressaltar a capacidade demonstrada pela levedura *C. lipolytica* de comportar-se simultaneamente como microrganismo degradador de óleo diesel e como microrganismo produtor de bioemulsificante(s)/biossurfactante(s), característica amplamente desejável em aplicações de biorremediação. O meio formulado neste trabalho, água do mar suplementada com 1,0% (p/v) de sulfato de amônio e 1,0% (p/v) de fosfato monobásico de potássio, assim como os bioemulsificantes/biossurfactantes sintetizados no mesmo por *C. lipolytica* tem potencial para remediação de locais contaminados por petróleo tanto de uma perspectiva econômica quanto ambiental. Desde que a salinidade típica nos ambientes marinhos é de 3,0 a 3,5 %, a levedura *C. lipolytica* também pode ser utilizada para bioremediação *in situ* em ambientes marinhos, já que nos experimentos realizados ela apresentou tolerância a salinidades de até 6,1%. Esse trabalho também fornece dados para modelagem, usando técnicas convencionas e de inteligência artificial, de processo de biodegradação de óleo diesel por *C. lipolytica* em água do mar.

## Referências

- Abalos SA, Vinas M, Sabate J, Manresa MA, Solanas AM (2004) Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* At10. *Biodegradation* 15:249-260.
- Abdel-Mawgoud AM, Aboulwafa MM, Hassouna NAH (2008) Characterization of Rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* Isolate Bs20. *Appl. Biochem. Biotechnol.* ISSN 0273-2289 (Print) 1599-0291 (Online), doi: 10.1007/s12010-008-8285-1.
- Aguilar CN, Rodríguez R, Gutierrez-Sanchez G, Augur C, Favela-Torres E, Prado-Barragan LA, Ramirez-Coronel A, Contreras-Esquível JC (2007) Microbial tannases: advances and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 47-59.
- Aguilar CN, Gutierrez-Sanchez G (2001) Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. *Food Science and Technology International* 7:373-382.
- Aguilar CN, Favela-Torres E, Viniegra-González G, Augur C (2002) Culture conditions dictate protease and tannase production in submerged and solid-state cultures of *Aspergillus niger* Aa-20. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 102–103(1–6):407–414.
- Aislabie J, Saul DJ; Foght JM (2006) Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremophiles : life under extreme conditions* 10(3):171-179.
- Albuquerque CDC (2006) Processo de Produção de Bioemulsificante por *Candida lipolytica*: Otimização, Ampliação de Escala e Desenvolvimento de Softsensor baseado em Redes Neurais Artificiais. Campinas, 2006. 340p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP.
- Albuquerque CDC, Fileti AMF, Campos-Takaki GM (2006) Optimizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. *Can. J. Microbiol.* 52(6):575-583.

- Albuquerque CDC, Fileti AMF, Campos-Takaki GM (2006) Neural Network Based Software Sensors: Application to Biosurfactant Production by *Candida lipolytica*. In: Antonio Mendez-Vilas (ed.) Modern Multidisciplinary Applied Microbiology: Exploiting Microbes and Their Interactions, Weinheim: Wiley-VCH. 628-632.
- Aoki K, Shinke R, Nishira H (1976) Purification and some properties of yeast tannase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40(1)79-85.
- Apha - American Public Health Association (1992), Standard Methods for Water and Wastewater, 18th ed.
- Ashok BT, Saxena S, Musarrat J (1995) Isolation and characterization of four polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from soil near an oil refinery. *Letters in Applied Microbiology*, 21:246-248.
- Atlas RM (1984) Pathways of microbial degradation of petroleum hydrocarbon: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45:180-209.
- Bai G, Brusseau ML, Miller RM (1997) Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. *J. Contam. Hydrol.* 25:157-170.
- Balba MT, Al-Shayji Y, Al-Awadhi N, Yateem A (2002) Isolation and characterization of biosurfactant-producing bacteria from oil-contaminated soil. *Soil and Sediment Contamination*, 11:41-55.
- Baldrian P (2003) Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 32:78–91.
- Battestin V, Macedo GA (2007) Purification and Biochemical Characterization of Tannase from a Newly Isolated Strain of *Paecilomyces Variotii*. *Food Biotechnology* 21:207-216.
- Battestin V, Matsuda LK, Macedo GA (2004) Fontes e Aplicações de Taninos e Tanases em Alimentos. *Alim. Nutr. Araraquara* 5(1):63-72.

- Bento FM, Camargo FAO, Okeke BC, Frankenberger-Jr WT (2005) Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiological Research* 160: 249-255.
- Boonchan S, Britz ML, Stanley GA (1998) Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biotechnol. Bioengineer* 59:482-494.
- Bossert ID, Kachel WM, Bartha R (1984) Fate of hydrocarbons during oily sludge disposal in soil. *Appl Environ Microbiol* 47:763–767.
- Box GEP, Hunter WG, Hunter JS (1978) *Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building*. New York: Wiley.
- Bruheim P, Bredholdt H, Eimhjellem K (1997) Bacterial degradation of emulsified crude oil and the effect of various surfactants. *Can. J. Microbiol.* 43:17-22.
- Byrne GS and Ward OP (1989). Effect of nutrition on pellet formation by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnology and Bioengineering* 33:912-914.
- Carmichael L.M, Pfaender FK (1997) The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils. *Biodegradation* 8:1-13.
- Cavallazzi JRP, Kasuya MCM, Soares MA (2005) Screening of Inducers For Laccase Production by *Lentinula Edodes* in Liquid Medium. *Brazilian Journal of Microbiology* 36:383-387.
- Chaîneau CH, Rougeux G, Yepremian C, Oudot J (2005) Effects of nutrients concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. *Soil Biol. Biochem.* 37: 1490-1497.
- Challain F, Chaîneau CH, Point V, Saliot A, Oudot J (2006) Factors inhibiting bioremediation of soil contamination with weathered oils and drill cuttings. *Environmental Pollution* 144:1:255-265.

- Challain F, Chaineau CH, Point V, Saliot A, Oudot J (2006) Factors inhibiting bioremediation of soil contamination with weathered oils and drill cuttings. *Environmental Pollution* 144:1:255-265.
- Cirigliano MC, Carman GM (1985) Purification and Characterization of Liposan, a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:846-850.
- Cirigliano MC, Carman GM (1984) Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:747-750.
- Cooney JJ (1984) The fate of petroleum pollutants in freshwater ecosystems. K 03099 Pollution; J 02905 Water; P 2000 Fresh Water Pollut.
- Cooper DG, Goldenberg BG (1987) Surface active agents from two *Bacillus species*. *Appl Environ Microbiol.* 53:224–229.
- Cooper DG, Padock DA (1984) Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Applied and Environmental Microbiology* 173-176.
- Crosman JT, Pinchuk RJ, Cooper DG (2002) Enhanced biosurfactant production by *Corynebacterium alkanolyticum* ATCC21511 using self-cycling fermentation, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79(5):467-472.
- Cruz-Hernandez M, Augur C, Rodríguez R, Contreras-Esquivel C, Aguilar CN (2006) Evaluation of Culture Conditions for Tannase Production by *Aspergillus niger* GH1. *Food Technol. Biotechnol.* 44(4):541-544.
- Davidson RW, Campbell WA, Blaisdell DJ (1938) Differentiation of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. *Journal Agriculture Research* 57:683-695.
- Dean SM, Jin Y, Cha DK, Wilson SW, Radosevich M (2001) Phenanthrene degradation in soils co-inoculated with phenanthrene-degrading and biosurfactant-producing bacteria. *J. Environ. Qual.* 30:1126-1133.

- Desai JD, Banat IM (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiol. Mol. Biol. R.* 61(1):47-64.
- Dua HS, Gomes JAP, King AJ (2004) The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv.Ophthalmol.* 49:51-77.
- Floodgate G (1984) The of petroleum in marine ecosystems. In: Atlas RM, ed. *Petroleum Microbiology*. New York, Macmillan. p. 355-398.
- Fispq 007 (2008) Ficha de Informação de Segurança/ RUFF. Disponível em: <[http://www.ruff.com.br/FISPQ007\\_OLEO\\_DIESEL\\_B3\\_METROPOLITANO.pdf](http://www.ruff.com.br/FISPQ007_OLEO_DIESEL_B3_METROPOLITANO.pdf)> Acesso em: 02 de agosto de 2008.
- Frielo DA, Mylroie JR, Chakrabarty AM (2001) Use of genetically engineered multi-plasmid microorganisms for rapid degradation of fuel hydrocarbons. *Intern. Biodet. Biodeg.* 48:233–242.
- Freixo MR, Karmali A, Frazão C, Arteiro JM (2008) Production of laccase and xylanase from *Coriolus versicolor* grown on tomato pomace and their chromatographic behaviour on immobilized metal chelates. *Process Biochemistry* 43:1265-1274.
- Gottschalk, Macedo and Bon (1999). In Bon EPS, Ferrara MA, Corvo ML (2008) *Enzimas em Biotecnologia. Produção, Aplicações e Mercado*. 1 Ed. Rio de Janeiro: Interciência Ltda. 95-122.
- Habba E, Espuny MJ, Busquets M, Manresa A (2000) Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils, *Journal of Applied Microbiology* 88 379.
- Herman DC, Zhang Y, Miller RM (1997) Rhamnolipid (biosurfactant) effects on cell aggregation and biodegradation of residual hexadecane under saturated flow conditions. *Appl Environ Microbiol.* 63 :3622–3627.

- Ioniță A, Moscovici M, Drăgolici A, Eremia M, Bucă C, Albulescu R, Pavel I, Vamanu MC (2001) Lipase Production in Discontinuous Operation System Using a *Candida lipolytica* Strain. *Roum. Biotechnol. Lett.* 7(1):547-552.
- Jung C, Parnell PG, Carter BJ, Harkins RG, Slattery TK, Halper J (1995). Characterization of antibodies to transforming growth factor type e and their use in immunolocalization of this growth factor. *Cell Vision* 2:468-476.
- Kappeli O, Fiechter A (1984) Advances in biotechnology. *In Proceedings of the 6th International Symposium on Fermentation, (1977) v. 1*, edited by M. Moo Young, *Journal Bacteriology* 131:17-21.
- Kerr RP and Capone DG (1988) The effect of salinity on the microbial mineralization of two polycyclic aromatic hydrocarbons in estuarine sediments. *Marine Environ.l Research* 26:181-198.
- Kumar M, Leon V, Materano ADS, Ilzins OA (2006) Enhancement of Oil Degradation by Co-culture of Hydrocarbon Degrading and Biosurfactant Producing Bacteria. *Polish J. of Microbiol.* 55(2):139-146.
- Kunamneni A, Ravuri BD, Ellaiah P, Prabhakhar T, Saisha V (2008) Urokinase - A strong plasminogen activator. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* 3(3):058–070.
- Kuyukina MS, Ivshina IB, Makarov SO, Litvinenko LV, Cunningham CJ, Philp JC (2005) Effect of biosurfactant on crude oil desorption and mobilization in a soil system. *Environ. Int.* 31:155-161.
- Leahy JG, Colwell RR (1990) Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment *Microbiological Reviews* 54(3):305-315.
- Lee M, Kim MK, Singleton I, Goodfellow M, Lee S-T (2006) Enhanced biodegradation of diesel oil by a newly identified *Rhodococcus baikonurensis* EN3 in the presence of mycolic acid. *Journal of Applied Microbiology* 100:325–333.

- Lin TC, Chang JS, Young CC (2008) Exopolysaccharides produced by *Gordonia alkanivornis* enhance bacterial degradation activity for diesel. *Biotechnol. Lett.* 30:1201-1206.
- Maneerat St and Dikit P (2007) Characterization of cell-associated bioemulsifier from *Myroides* sp. SM1, a marine bacterium. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 29(3):770-779.
- Margesin R, Hammerle M, Tscherko D. (2007) Microbial Activity and Community Composition during Bioremediation of Diesel-Oil-Contaminated Soil: Effects of Hydrocarbon Concentration, Fertilizers, and Incubation Time. *Microbial Ecology*, 53:259–269.
- Margesin R, Schinner F (1997) A feasibility study for the in situ remediation of a former tank farm. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15:615-622.
- Margesin R, Zimmerbauer A, Schinner F (1999) Soil lipase activity – a useful indicator of oil biodegradation. *Biotechnology Techniques* 13:859–863.
- Mariano AP, Bonotto DM, Angelis DF, Piróllo MPS, Contiero J (2008) Use of Weathered Diesel Oil as a Low-Cost Raw Material for Biosurfactant Production. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 25(02):269 – 274.
- Mariano AP, Kataoka APAG, De Angelis DF, Bonotto (2007) Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:346-353.
- Mihelcic JR, Pritschow A, Leuking DR (1995). Uptake of dissolved and oil phase organic chemicals by bacteria. *Ground Water Monit Rev.* 15:100-06.
- Milewski S (2001) Protein Structure and Physicochemical Properties. In: *Chemical and Functional Properties of Food Proteins*. Sikorski, Z.E. (Ed) Technomic Publishing Company, Inc. Pennsylvania 35-55.
- Miller RM (1995) Surfactant-enhanced bioavailability of slightly soluble organic compounds. In *Bioremediation: Science and Applications* ed. Skipper, H.D. and Turco, R.F. Madison, WI: Science Society of America. 223–254.

- Miura Y Mechanism of liquid hydrocarbon uptake by microorganism and growth kinetics. *In* Advances in biochemical engineering, edited by T.K. Ghosh A. Fiechter and N. Blakebrough (1978) Springer Verlag, New York 31-56.
- Mondal KC, Banerjee R, Pati BR (2000) Tannase production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters* 0:767–769.
- Montgomery DC (1997) Design and analysis of experiments. New York: Wiley.
- Moraes IO, Benincasa M, Monte Alegre R (2002) Production and characterization of rhamnolipids produced by a newly isolated strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Braz. J. Food Technol.* 5:145-149.
- Muriel MM, Bruque JM, Olías JM, Jiménez-Sánchez (1996) Production of Biosurfactant by *Cladosporium resinae*. *Biotechnology Letters*, 18(3):235-240.
- Nakahara T, Hisatsuka K, Minoda Y (1981) Effect of hydrocarbon emulsification on growth and respiration of microorganisms in hydrocarbon media. *J. Ferment. Technol.* 59:415-418.
- Neu TR and Pralla K (1996) Emulsifying agent from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic surfaces. *Appl. Microbiol. Technol.* 60:151-66.
- Noordman WH, Janssen DB (2002) Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 68:4502–4508.
- Ochoa JL and Vázquez-Juárez R (2004) Las levaduras marinas como herramientas científica y biotecnológica. *Universidad y Ciencia.* 1:39-50.
- Oudot, Claude, Pascal Morin, Francois Baurand, Mohideen Wafar, Pierre Le Corre (1998) Northern and southern water masses in the equatorial Atlantic: distribution of nutrients on the WOCE A6 and A7 lines. *Deep-Sea Research I* 45:873-902.

- Pareilleux A. (1979) Hydrocarbon assimilation by *Candida liposurfactant* by a known oil degrader. In *Ocean Technology Per-lytica* : formation of a biosurfactant. Effects on respiratory activity *spectives* ed. Kumar, S., Agadi, V.V., Keshavdas, V. and Desai, and growth. European Journal of Applied Microbiology 8, 91–101.
- Pavitrans S, Jagtap CB, Subramanian SB, Titus S, Pradeep-Kumar P, Deb PC (2006) Microbial Bioremediation of Fuel Oil Hydrocarbons in Marine Environment. Defence Science Journal 56(2):209-224.
- Peralta RM, Souza CGM, Boer CG (2004) As principais oxirredutases de uso industrial. In: Suraia Said; Rosemeire C. L. R. Pietro. (Org.). Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto - SP: Editora Legis Summa Ltda 161-184,
- Peters II and Nelson FE (1951) Vitamin Requirements for Lipase Production by *Candida Lipolytica*. Dairy Industry Section, Iowa Agricultural Experiment Station, Ames, Iowa 61:591-593.
- Piróllo MPS (2006) Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. 2006. 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.
- Pirt SJ and Callow DS (1959) Continuous-flow culture of the filamentous mould *Penicillium chrysogenum*. And the control of its morphology. Nature, 184:307-310.
- Pirt SJ (1975) Principles of microbe and cell cultivations. Londres: Blackwell Scientific Publications 275:214-215.
- Plaza GA, Zjawiony I, Banat IM (2006) Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. Journal of Petroleum Science and Engineering 50:71– 77.
- Rahman KSM, Rahman TJ, Kourkoutas Y, Petsas I, Marchant R, Banat IM (2003) Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. Bioresour Technol. 90:159–168.

- Ramírez-Orozco M, Hernández-Saavedra NY, Ascencio-Valle F, Acosta-González B, Ochoa JL (1998) Cell yield and Superoxide Dismutase activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* under different culture conditions. J. Mar. Biotechnol. 6: 255-259.
- Rancano G, Lorenzo M, Molares N, Rodriguez Couto S, Sanromán MA (2003) Production of laccase by *Trametes versicolor* in an airlift fermentor. Process Biochemistry 39(4):467-473.
- Rapp P, Bock H, Wray V, Wagner F (1979) Formation, isolation and characterization of trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. J. Gen. Microbiol. 115:491-503.
- Ratledge C *In* Hydrocarbons in biotechnology, edited by D.E.F. Harrison, I.J. Higgins and R.Watkinson (1980) Heyden and Son, London, 1980. 133p.
- Reisfeld A, Rosenberg E, Gutnick D (1972) Microbial degradation of crude oil: factors affecting the dispersion in sea water by mixed and pure culture. Appl. Microbiol. 24:363-368.
- Riffaldi R, Levi-Minzi R, Cardelli R, Palumbo S and Saviozzi A (2006) Soil biological activities in monitoring the bioremediation of diesel oil-contaminated soil. Water Air Soil Pollut. 170:3-17.
- Rolling WF, Milner MG, Jones DM, Daniel F, Swannel RJ, Head IM (2002). Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. Appl. Environ. Microbiol. 68(11): 5537-5548.
- Roongsawang N, Thaniyavarn J and Thaniyavarn S (1999) Properties of biosurfactant produced by *Bacillus* sp. strain KP-2. Thai J. Biotechnol. 1:54-60.
- Rosenberg E, Ron EZ (1999) High and low-molecular-mass microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52:154-162.

- Rosenberg M (1984) Bacterial adgerance to hydrocarbons: a useful technique for studying hydrophobicity. FEMS Microbiol. Lett. 22:289-95.
- Sabate J, Vinas M, Solanas AM (2004) Laboratory scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated solils. Internl. Biodeter. Biodegrad. 54:19-25.
- Sadouk Z, Hacene H, Tazerouti A (2008) Biosurfactants Production from Low Cost Substrate and Degradation of Diesel Oil by a Rhodococcus Strain. Oil & Gas Science and Technology - Rev. IFP. 63(6):747-753.
- Sharma S, Agarwal L, Saxena RK (2008) Purification, immobilization and characterization of tannase from *Penicillium variable*. Bioresource Technology. 99(7):2544-2551.
- Shiaris MP (1989) Seasonal biotransformation of naphthalene, phenanthrene and benzo(a)pyrene in surficial estuarine sediments. Appl. Environ. Microbiol 55:1391-1399.
- Singer, TP, Salach JI and Crabtree D. (1985). Reversible inhibition and mechanism-based irreversible inactivation of monoamine oxidases by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Biochem Biophys Res Commun 127:707-712.
- Singh M and Desai JD (1989) Hydrocarbon emulsification by *Candida tropicalis* and *Debaryomyces polymorphus*. Indian Journal of Experimental Biology 27:224–226.
- Singh M, Desai JD (1985) Uptake of waterinsluble substtrates by microorganisms. J. Sci.Ind. Res 45:413-417
- Singh M, Saini VS, Adhikari DK, Desai JD, Sista VR (1990) Production of bioemulsifier by a SCP-producing strain of *Candida tropicalis* during hydrocarbon fermentation. Biotechnology Letters 12(10):743-746.
- Stelmack PL, Gray MR, Pickard MA (1999) Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. Appl. Environ. Microbiol. 65:163-168.

- Turki S, Kraeim IB, Weeckers F, Thonart P, Kallel H (2009) Isolation of bioactive peptides from tryptone that modulate lipase production in *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology* 100:2724–2731.
- Urum K, Pekdemir T (2004) Evaluation of biosurfactant for crude oil contaminated soil washed. *Chemosphere, Oxford*, 57:1139-1150.
- Vance-Harrop MH, Sarubbo LA, Carneiro da Cunha, MG, Buarque-Gusmão N, Campos-Takaki GM (1999) Produção de biossurfactante em meio de cultura de baixo custo suplementado com óleo de milho por *Candida lipolytica*. *Revista Symposium* 2:23-27.
- Vance-Harrop MH (2000) Influência de fontes de carbono D-glicose e óleo de babaçu no crescimento de *Candida lipolytica* e na produção de biossurfactantes. Recife, 2000. 72p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) - Centro de Ciências Biológicas, UFPE, 2000.
- Vance-Harrop MH, Buarque-Gusmão N, Campos-Takaki GM (2003) New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources. *Braz. J. of Microbiol.* 34:120-123.
- Vorderwulbecke T, Kieslich K, Erdmann H (1992), Comparison of lipases by different assays. *Enzyme and Microbial Technology* 14:631-639.
- Ward DM, Brock TD (1978) Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. *Appl Environ Microbiol* 35:353–359.
- Zinjarde S, Chinnathambi S, Lachke AH, Pant A (2003) Isolation of an emulsifier from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 using a modified mini isoelectric focusing unit. *Lett. Environ. Microbiol.*, v.37, p. 414-420.

## Anexos

Tabela 1. Caracterização físico-química de água do mar\*

<b>Parâmetro Físico-químico</b>	<b>Valor</b>
Condutividade elétrica a 20° C	49100,00
Dureza Total	6500,00
Cálcio (mg/L em Ca)	1002,00
Magnésio (mg/L em Mg )	972,80
Sódio (mg/L em Na )	11125,00
Potássio (mg/L em K )	875,00
Cloretos (mg/L em Cl)	20500,00
Sulfatos (mg/L em SO <sub>4</sub> )	3408,00

\*Praia próxima a refinaria Abreu e Lima, no Porto de Suape, em Pernambuco.

Tabela 2. Composição iônica dos seis principais sais presentes na água do mar

<b>Íon</b>	<b>Composição iônica da água do mar* (%)</b>	<b>Abundância iônica na água do mar* (%)</b>
Cálcio (Ca <sup>++</sup> )	1,00	2,64
Magnésio (Mg <sup>++</sup> )	0,97	2,57
Sódio (Na <sup>+</sup> )	11,13	29,37
Potássio (K <sup>+</sup> )	0,88	2,31
Cloretos (Cl <sup>-</sup> )	20,50	54,11
Sulfatos (SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> )	3,41	9,00
Total	37,88	100,00

\*Praia próxima a Refinaria Abreu e Lima, no Porto de Suape, Pernambuco, Brasil.

Tabela 3. Níveis e valores das variáveis independentes (ou fatores) do 1º planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup>

Variável Independente		Nível		
		-1	0	+1
Óleo diesel	(%v/v)	3,00	9,00	15,00
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	(%p/v)	0,10	0,25	0,40
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(%p/v)	0,10	0,60	1,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(%p/v)	0,68	1,36	2,04

Tabela 4. Níveis e valores das variáveis independentes (ou fatores) do 2º planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup>

Váriável Independente	Nível		
	-1	0	+1
Água do mar (% v/v)	0	50	100
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO (% p/v)	0	0,25	0,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (% p/v)	0,2	0,4	0,6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (% p/v)	0,5	1	1,5

Tabela 5. Composições dos meios de crescimento dos inóculos do 2º planejamento fatorial

<b>Composição Meio Inóculo</b>	<b>Água do Mar (%v/v)</b>	<b>(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO (%p/v)</b>	<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (%P/V)</b>	<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (%P/V)</b>
1	0	0,25	0,4	1
2	50	0,25	0,4	1
3	100	0,25	0,4	1

Tabela 6. Níveis e valores das variáveis independentes (ou fatores) do 3º planejamento fatorial completo  $2^3$ 

Fator	Nível		
	-1	0	+1
pH	4	7	10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (% p/v)	0,0	0,5	1,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (% p/v)	1,0	1,5	2,0

Tabela 7. Matriz do 1º Planejamento Fatorial Completo 2<sup>4</sup> decodificada e resultados de atividade de emulsificação (AE) para emulsão água-em-óleo de milho, tensão superficial (TS), pH e salinidade de filtrados livres de células, com 168h de cultivo.

Ensaio	Óleo diesel (%v/v)	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO (%p/v)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%p/v)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (%p/v)	AE (UAE)	TS (mN/m)	pH	Salinidade (‰)
1	1,0	0,10	0,10	0,68	6,000	49,22	5,14	46
2	5,0	0,10	0,10	0,68	5,996	47,33	5,19	45
3	1,0	0,40	0,10	0,68	5,872	49,14	6,08	42
4	5,0	0,40	0,10	0,68	5,784	43,48	5,65	50
5	1,0	0,10	1,10	0,68	6,000	52,55	5,44	53
6	5,0	0,10	1,10	0,68	5,836	49,15	5,11	56
7	1,0	0,40	1,10	0,68	5,844	46,28	5,87	46
8	5,0	0,40	1,10	0,68	5,454	52,43	5,68	57
9	1,0	0,10	0,10	2,04	5,654	50,84	4,97	53
10	5,0	0,10	0,10	2,04	5,692	53,61	4,92	53
11	1,0	0,40	0,10	2,04	5,830	49,21	6,02	55
12	5,0	0,40	0,10	2,04	5,982	50,13	5,93	53
13	1,0	0,10	1,10	2,04	5,658	49,13	5,07	61
14	5,0	0,10	1,10	2,04	5,984	48,16	5,07	65
15	1,0	0,40	1,10	2,04	5,682	47,16	5,85	61
16	5,0	0,40	1,10	2,04	5,796	51,94	5,72	60
17	3,0	0,25	0,60	1,36	6,000	51,44	5,39	49
18	3,0	0,25	0,60	1,36	6,000	46,68	5,35	45
19	3,0	0,25	0,60	1,36	5,852	49,56	5,41	51
20	3,0	0,25	0,60	1,36	6,000	48,91	5,69	48

Tabela 8. Matriz do 2º Planejamento Fatorial Completo 2<sup>4</sup> decodificada e resultados de atividade de emulsificação para emulsão água-em-óleo de milho (AEM), água em-hexadecano (AEH) e água-em-óleo diesel (AED) e tensão superficial (TS) de filtrados livres de células, com 168h de cultivo.

Ensaio	Água Mar (%v/v)	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO (%p/v)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%p/v)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (%p/v)	AEM (UAE)	AEH (UAE)	AED (UAE)	TS (mN/m)
1	0	0	0,2	0,5	6,00	0	0	45,05
2	100	0	0,2	0,5	5,77	0	0	46,47
3	0	0,5	0,2	0,5	6,00	0	0	53,3
4	100	0,5	0,2	0,5	6,00	0	0	53,57
5	0	0	0,6	0,5	5,82	0	0	52,27
6	100	0	0,6	0,5	6,00	0	0	53,24
7	0	0,5	0,6	0,5	6,00	0	0	50,58
8	100	0,5	0,6	0,5	6,00	0	0	46,67
9	0	0	0,2	1,5	5,66	0	0	47,54
10	100	0	0,2	1,5	5,37	0	0	43,76
11	0	0,5	0,2	1,5	5,94	0	0	47,61
12	100	0,5	0,2	1,5	5,78	0	0	47,58
13	0	0	0,6	1,5	5,91	0	0	42,35
14	100	0	0,6	1,5	5,98	0	0	50,98
15	0	0,5	0,6	1,5	6,00	0	0	42,22
16	100	0,5	0,6	1,5	6,00	0	0	48,44
17	50	0,25	0,4	1	6,00	4,18	3,80	49,44
18	50	0,25	0,4	1	6,00	4,69	3,38	44,26
19	50	0,25	0,4	1	6,00	4,25	3,40	47,75
20	50	0,25	0,4	1	5,95	4,17	3,82	49,21

Tabela 9. Matriz do 3º Planejamento Fatorial Completo 2<sup>3</sup> decodificada e resultados de concentração celular do cultivo (CPML) com 120 horas, atividade de emulsificação (AE) para emulsão água-em-óleo de milho, tensão superficial (TS), pH final, salinidade (SAL) de cultivos de 120 horas livres de células. O pH inicial dos cultivos é fornecido na primeira coluna da tabela.

<b>Ensaio</b>	<b>pH inicial</b>	<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (%p/v)</b>	<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (%p/v)</b>	<b>CPML (cel/mL)</b>	<b>AE (UAE)</b>	<b>TS (mN/m)</b>	<b>pH final</b>	<b>SAL (‰)</b>
1	4.0	0	1,0	1 x 10 <sup>2</sup>	5,808	51,32	4,26	44
2	10.0	0	1,0	2 x 10 <sup>2</sup>	6	48,47	7,95	40
3	4.0	1,0	1,0	1 x 10 <sup>2</sup>	5,818	54,79	3,48	54
4	10.0	1,0	1,0	6 x 10 <sup>6</sup>	5,746	47,44	9,72	48
5	4.0	0	2,0	1 x 10 <sup>2</sup>	5,852	51,97	3,82	50
6	10.0	0	2,0	2 x 10 <sup>3</sup>	6	46,79	9,18	50
7	4.0	1,0	2,0	1 x 10 <sup>2</sup>	6	50,8	3,77	60
8	10.0	1,0	2,0	3 x 10 <sup>3</sup>	5,526	41,29	9,59	51
9	7.0	0,5	1,5	2 x 10 <sup>2</sup>	5,846	51,09	6,61	47
10	7.0	0,5	1,5	2 x 10 <sup>2</sup>	5,986	55,83	6,67	47
11	7.0	0,5	1,5	1 x 10 <sup>2</sup>	6	53,95	6,66	47
12	7.0	0,5	1,5	1 x 10 <sup>2</sup>	5,884	48,23	6,74	48

Tabela 10. Perfis cinéticos da levedura *C. lipolytica* cultivada sob diferentes condições nutricionais: (C1) Água do mar + Óleo diesel - composição idêntica a do ensaio 4 do terceiro planejamento; (C2) Água destilada + Óleo diesel e (C4) Água destilada + Óleo de milho.

Perfil cinético	Condição 1	Condição 2	Condição 4
Fase de decaimento (h)	0 - 24	0 - 24	72 - 96
Taxa de decaimento celular ( $h^{-1}$ )	- 0,17	- 0,29	- 0,11
Fase de crescimento exponencial (h)	24 - 48	ND <sup>1</sup>	24 - 48
Velocidade de crescimento máxima $\mu_{max}$ ( $h^{-1}$ )	0,11	0	0,21
Tempo de geração G (min)	6,4	0	3,3
Fase estacionária (h)	72 - 96	24 - 96	48 - 72
Concentração celular máxima (UFC/mL)	$1 \times 10^6$	ND <sup>1</sup>	$9 \times 10^8$
Variação de pH (0 a 96h)	9,6-9,5	9,7-9,1	9,2-6,1

<sup>1</sup>ND – Não determinado

## LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Diagrama de Pareto para 1º planejamento fatorial  $2^4$  tendo como variáveis independentes as concentração de (1) diesel, (2) uréia, (3) sulfato de amônia e (4) fosfato de potássio e como variável resposta a atividade de emulsificação para emulsões água em óleo de milho.

Figura 2. Diagrama de Pareto para 1º planejamento fatorial  $2^4$  tendo como variáveis independentes as concentração de (1) diesel, (2) uréia, (3) sulfato de amônia e (4) fosfato de potássio e como variável resposta a tensão superficial.

Figura 3. Diagrama de Pareto para 2º planejamento fatorial  $2^4$  tendo como variáveis independentes as concentração de (1) água do mar, (2) uréia, (3) sulfato de amônia e (4) fosfato de potássio e como variável resposta a atividade de emulsificação para emulsões água em óleo de milho

Figura 4. Diagrama de Pareto para 2º planejamento fatorial  $2^4$  tendo como variáveis independentes as concentração de (1) água do mar, (2) uréia, (3) sulfato de amônia e (4) fosfato de potássio e como variável resposta a tensão superficial.

Figura 5. Diagrama de Pareto para 3º planejamento fatorial  $2^3$  tendo como variáveis independentes as concentração de (1) pH inicial, (2) sulfato de amônia e (3) fosfato de potássio e como variável resposta a atividade de emulsificação para emulsões água em óleo de milho.

Figura 6. Diagrama de Pareto para 3º planejamento fatorial  $2^3$  tendo como variáveis independentes as concentração de (1) pH inicial, (2) sulfato de amônia e (3) fosfato de potássio e como variável resposta a tensão superficial.

Figura 7. Diagrama de Pareto para 3º planejamento fatorial  $2^3$  tendo como variáveis independentes as concentração de (1) pH inicial, (2) sulfato de amônia e (3) fosfato de potássio e como variável resposta a concentração celular com 120 horas de cultivo.

Figura 8. Diagrama de Pareto para 3º planejamento fatorial  $2^3$  tendo como variáveis independentes as concentração de (1) pH inicial, (2) sulfato de amônia e (3) fosfato de potássio e como variável resposta o pH final.

Figura 9. Diagrama de Pareto para 3º planejamento fatorial  $2^3$  tendo como variáveis independentes as concentração de (1) pH, (2) sulfato de amônia e (3) fosfato de potássio e como variável resposta a salinidade

Figura 10. Cultivos de *C.lipolytica* crescida durante 120 horas, a 28°C e 150 rpm, em água do mar natural suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo e tendo óleo diesel como única fonte de carbono,; (a) meio 1 (pH inicial 4) (b) meio 4 (pH inicial 10) e (c) meio 10 ( pH inicial 7) .

Figura 11. Cultivos de *C.lipolytica* crescida durante 120 horas, a 28°C a 150 rpm, em água do mar natural suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo e tendo óleo diesel como única fonte de carbono, em pH 10,0. (a) Cultivo com microrganismo (b) Controle – cultivo sem microrganismo

Figura 12. Crescimento de *C.lipolytica* em diferentes condições de cultivo: (C1) Água do mar + Óleo diesel - composição idêntica a do ensaio 4 do terceiro planejamento; (C2) Água destilada + Óleo diesel; (C3) Água do mar + Óleo de milho; (C4) Água destilada + Óleo de milho.

Figura 13. Perfis de (a) crescimento, tensão superficial, salinidade e (b) pH e atividades de emulsificação para óleo de milho e óleo de motor da levedura *C.lipolytica* UCP 988 crescida em água do mar tendo óleo diesel como única fonte de carbono. Perfis de (c) crescimento, tensão superficial, salinidade e (d) pH e atividades de emulsificação para óleo de milho e óleo de motor da levedura *C.lipolytica* UCP 988 crescida em água destilada tendo óleo diesel como única fonte de carbono.

Figura 14. Perfis de (a) crescimento, tensão superficial, salinidade e (b) pH e atividades de emulsificação para óleo de milho e óleo de motor da levedura *C.lipolytica* UCP 988 crescida em água do mar tendo óleo de milho como única fonte de carbono. Perfis de (c) crescimento, tensão superficial, salinidade e (d) pH e atividades de emulsificação para óleo de milho e

óleo de motor da levedura *C.lipolytica* UCP 988 crescida em água destilada tendo óleo de milho como única fonte de carbono.

Figura 15. Curvas de estabilidade dos índices de emulsificação de emulsões formadas entre o cultivo de 96 horas livre de células de *C.lipolytica* UCP 988 - nas condições C1,C2, C3 e C4 - e óleo de milho ou óleo de motor.

Figura 16. Detecção qualitativa de tanase em amostras de líquidos metabólicos de *C. lipolytica* crescida em água do mar suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo, usando óleo diesel como única fonte de carbono.

Figura 17. Cinética de Produção de Lacase por *C.lipolytica* UCP 988 nas condições: (C1) Água do mar + óleo diesel; (C2) Água destilada + óleo diesel;(C3) ) Água do mar + óleo de milho e (C4) Água destilada + óleo de milho.

Figura 18. Cinética de Produção de Tanase por *C.lipolytica* UCP 988 nas condições: (C1) Água do mar + óleo diesel; (C2) Água destilada + óleo diesel;(C3) ) Água do mar + óleo de milho e (C4) Água destilada + óleo de milho

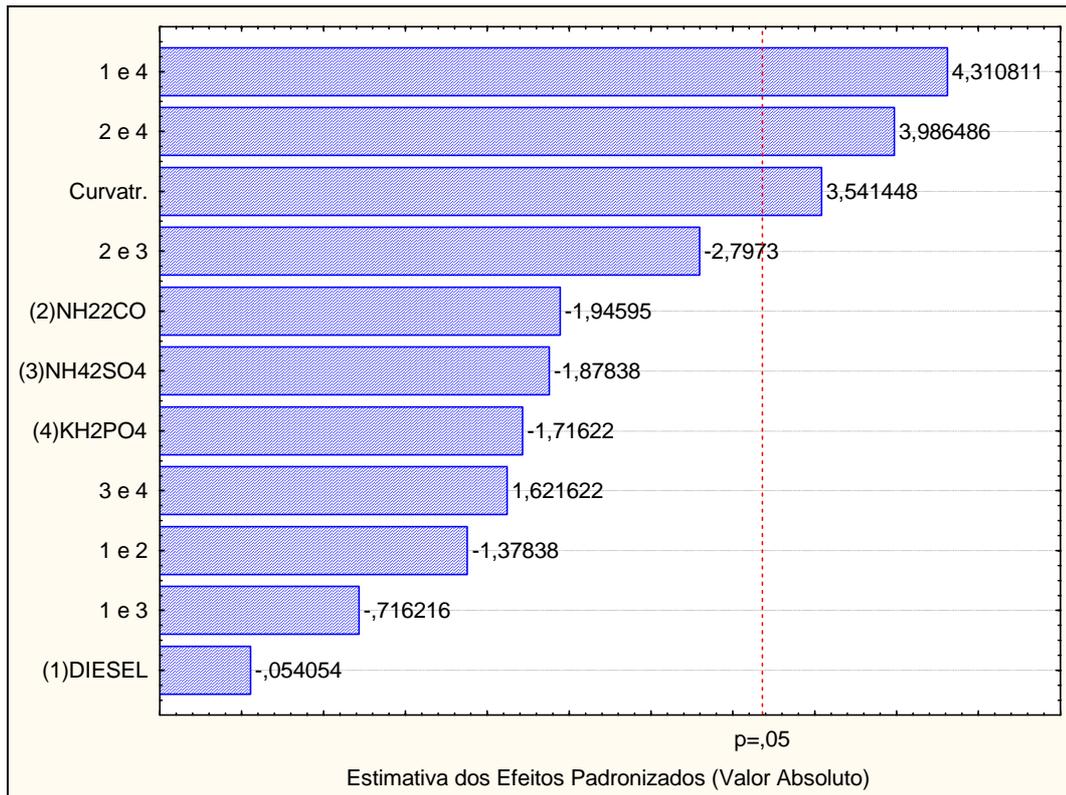


Figura 1

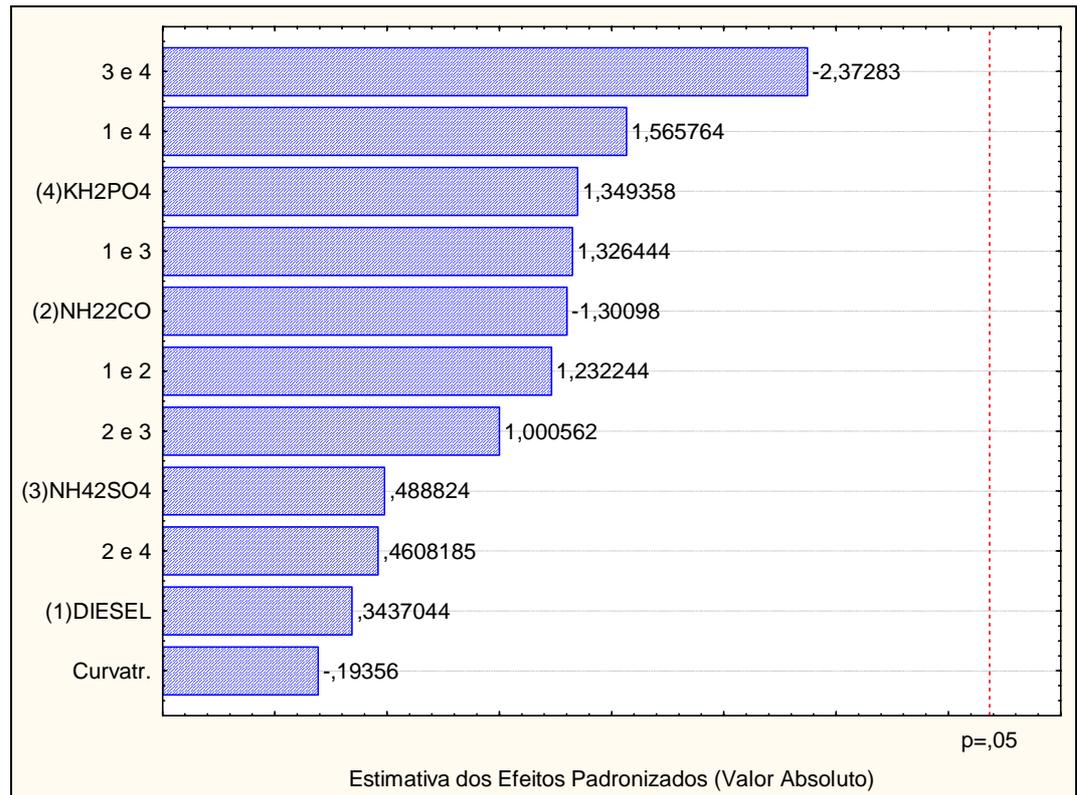


Figura 2.

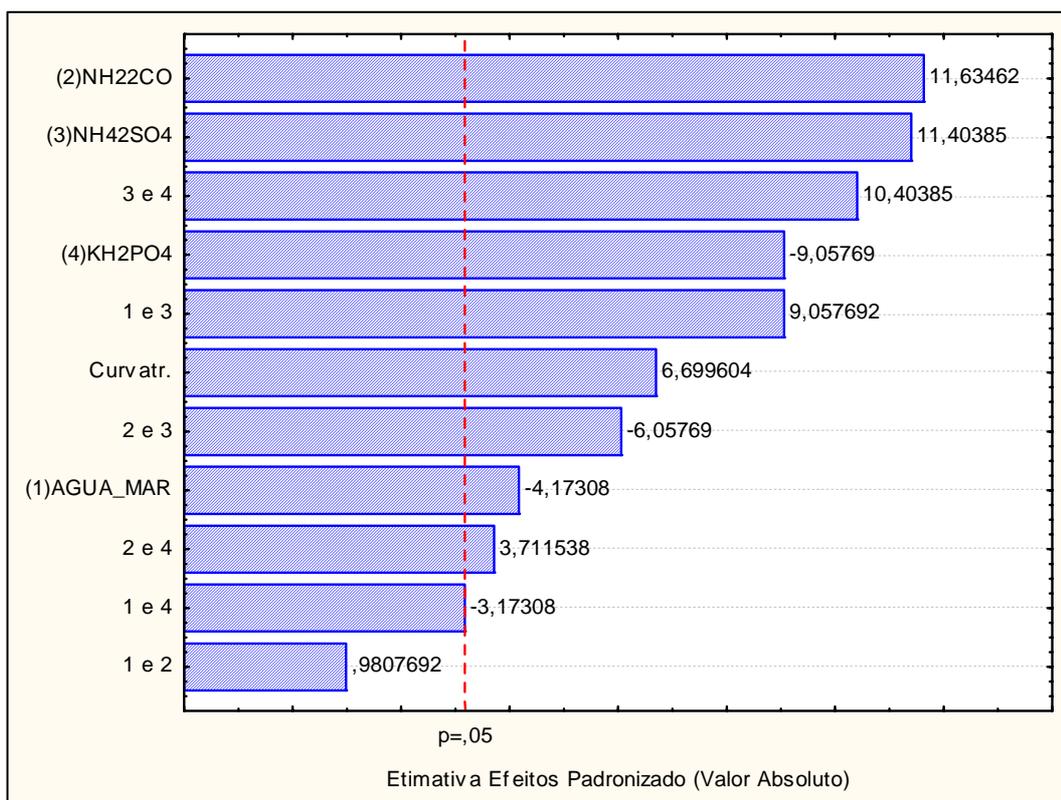


Figura 3.

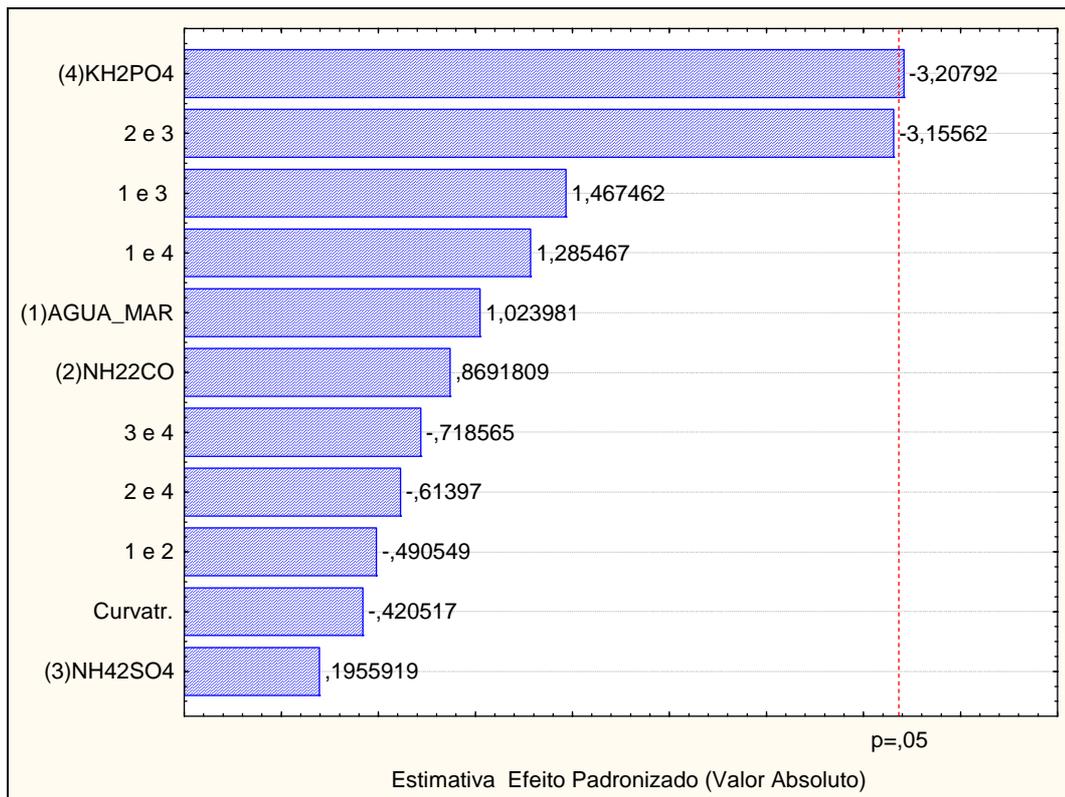


Figura 4.

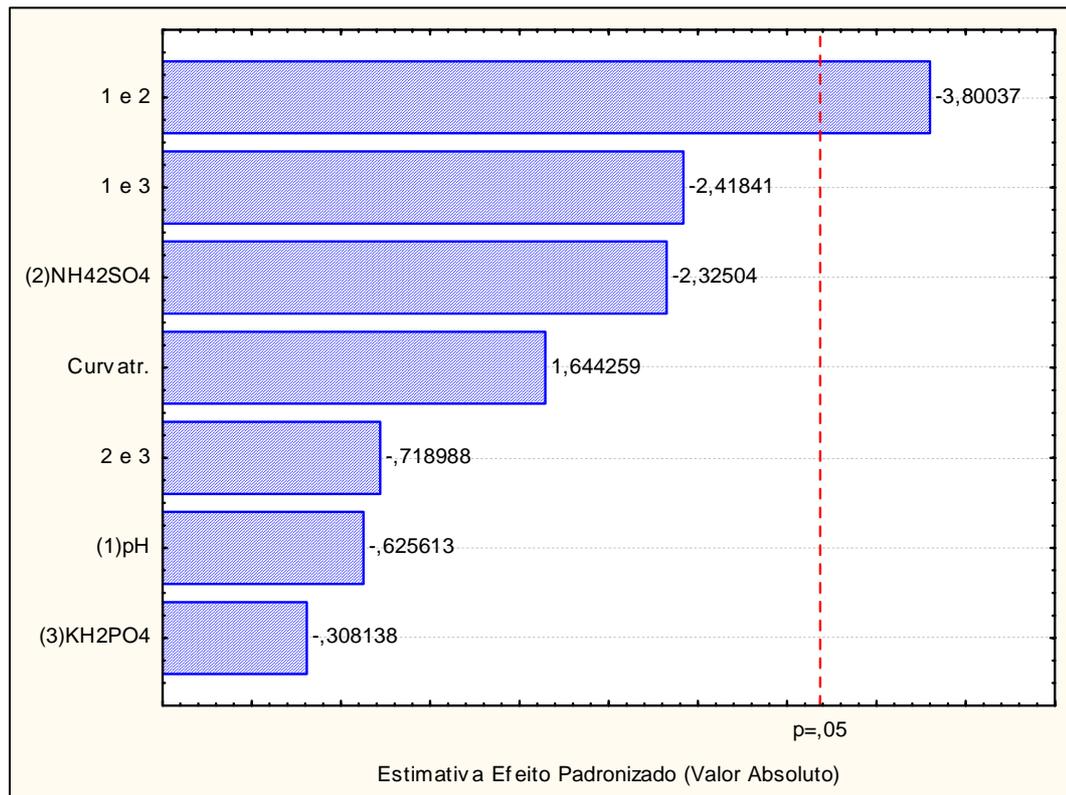


Figura 5.

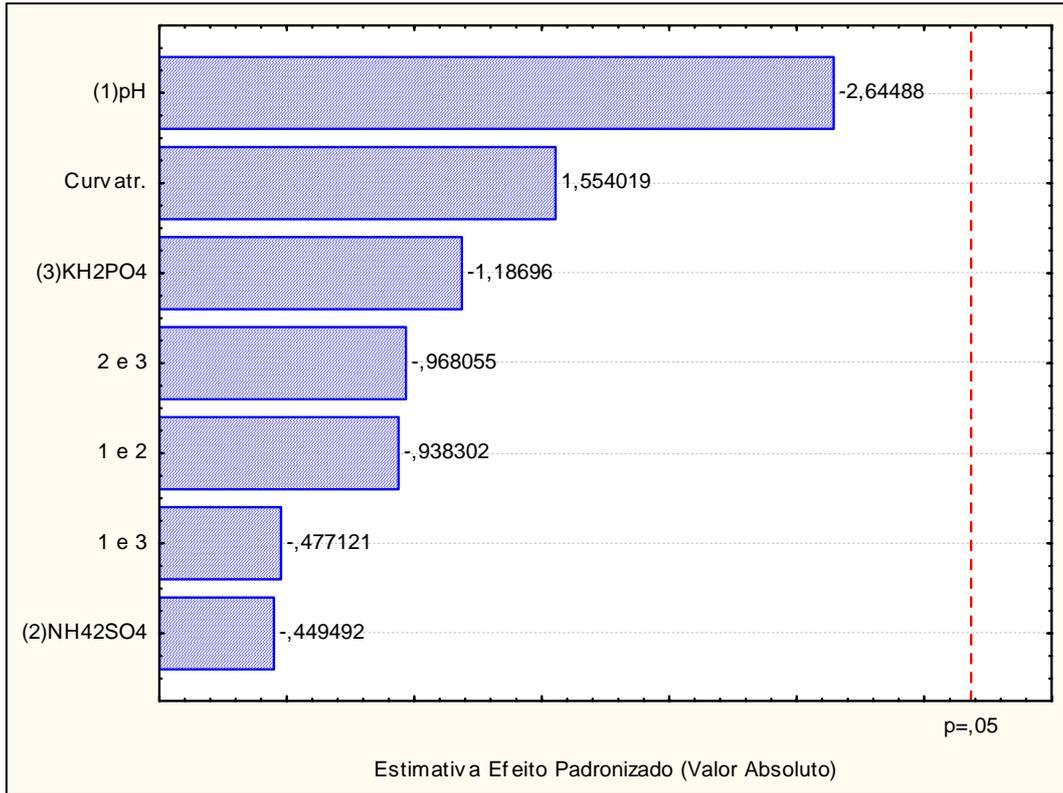


Figura 6.

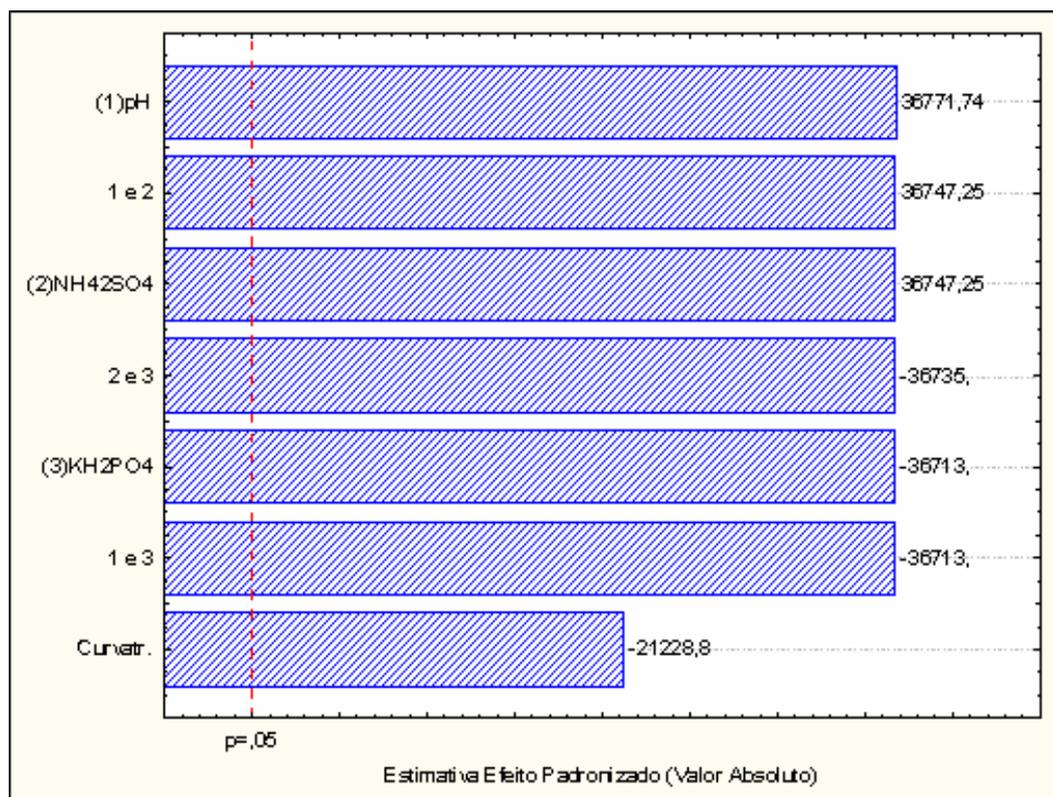


Figura 7.

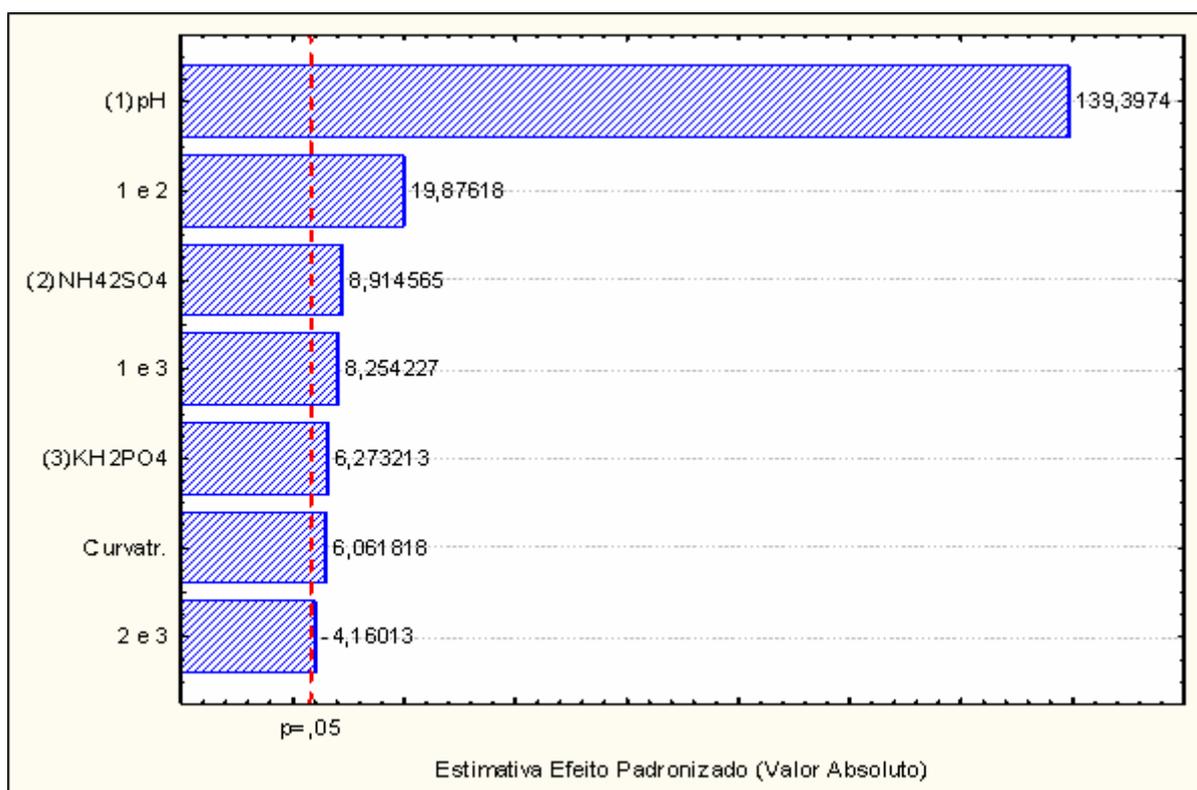


Figura 8.

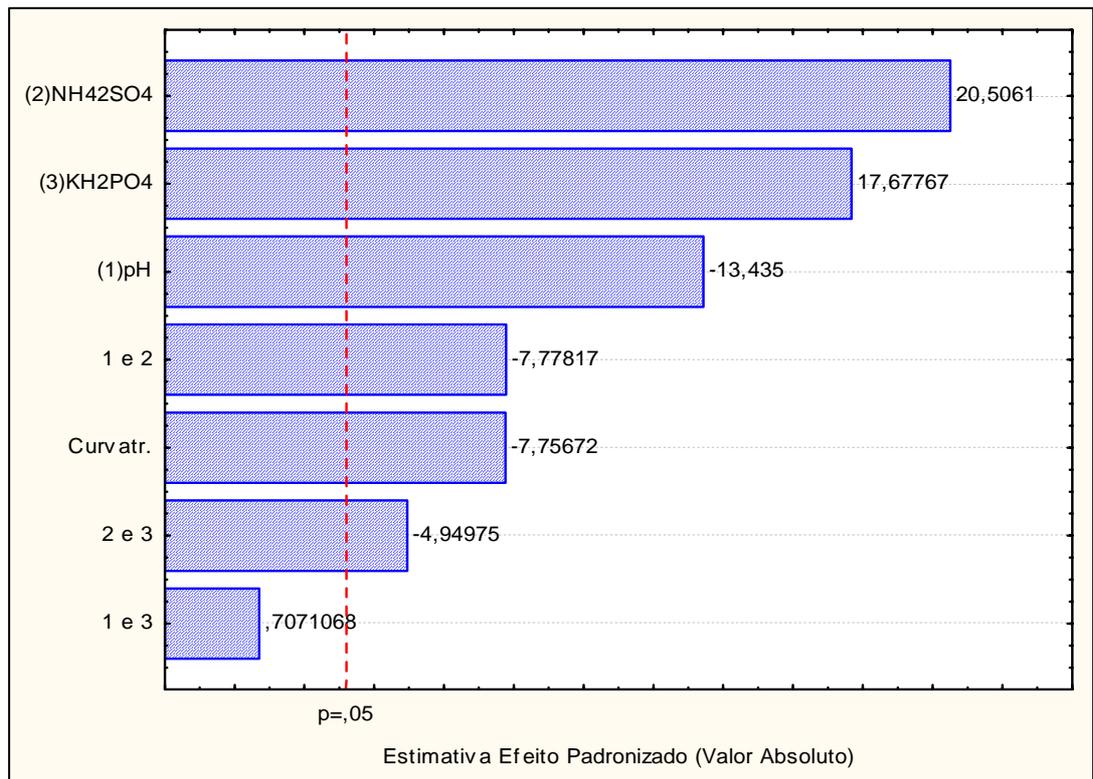


Figura 9.



Figura 10.

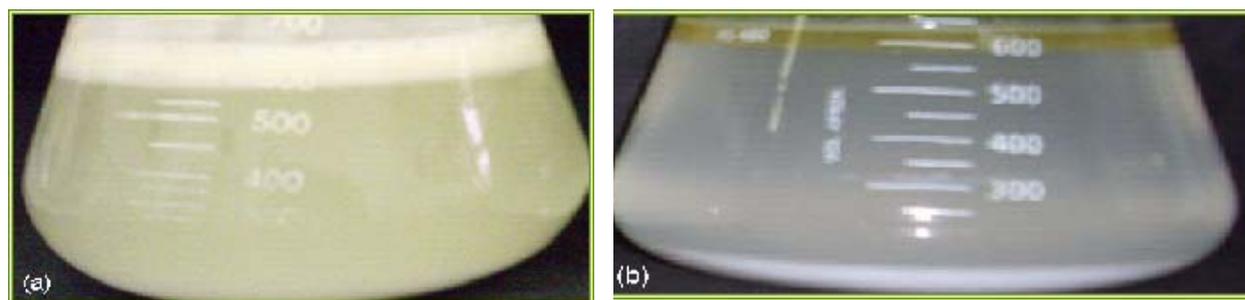


Figura 11.

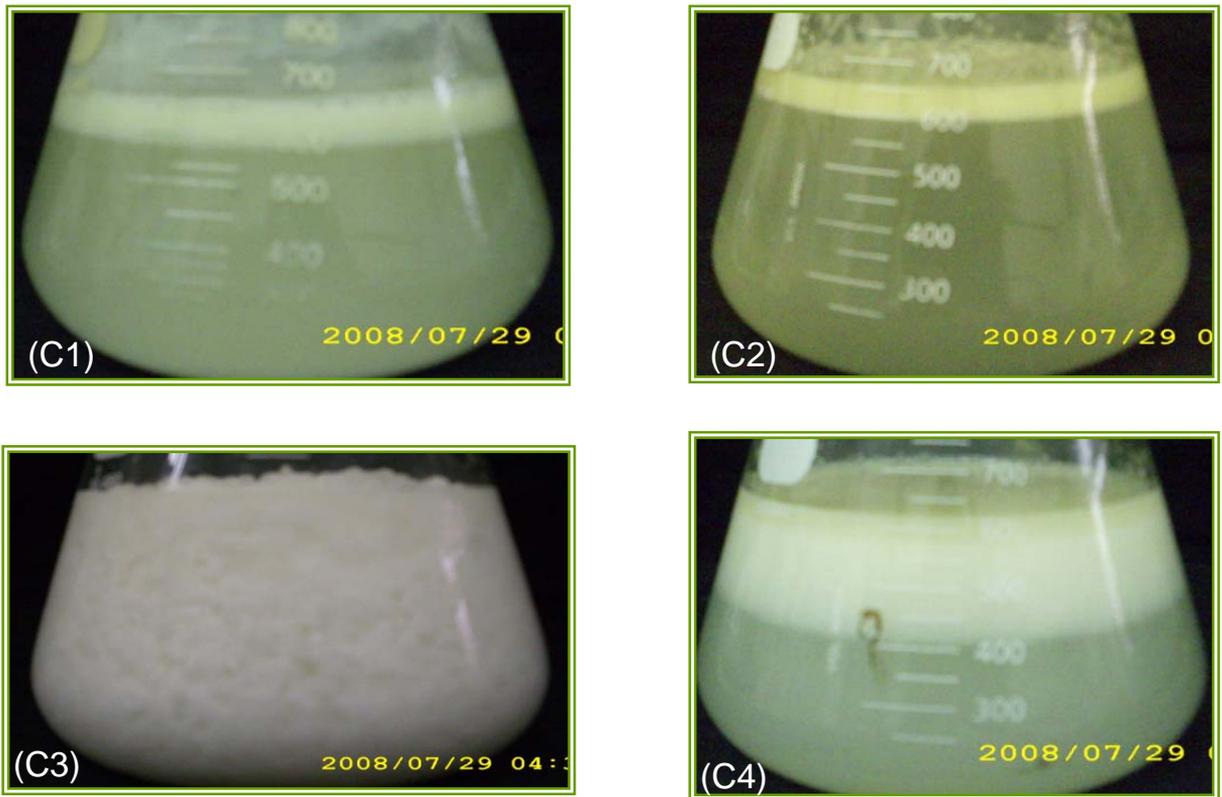


Figura 12.

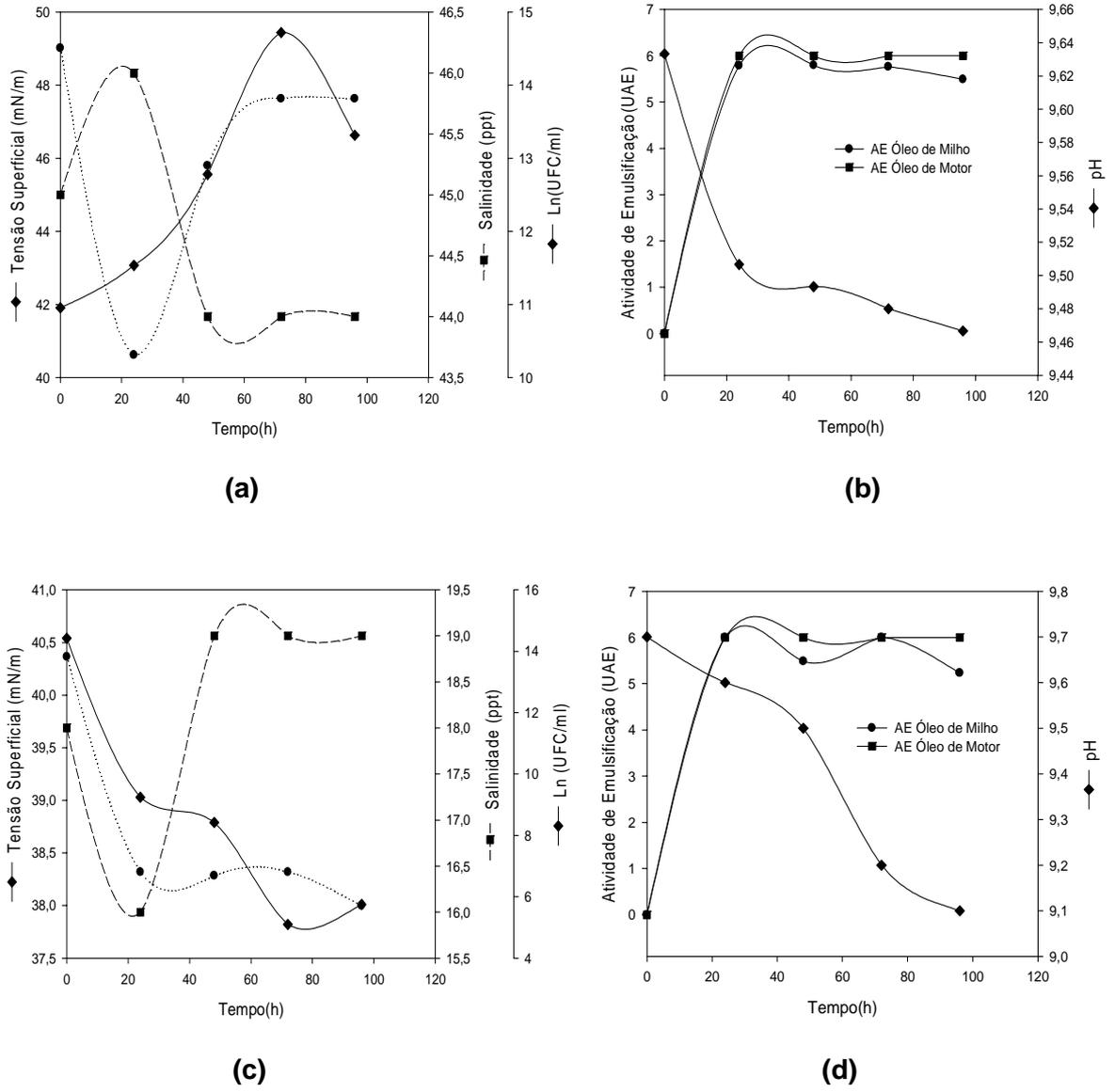
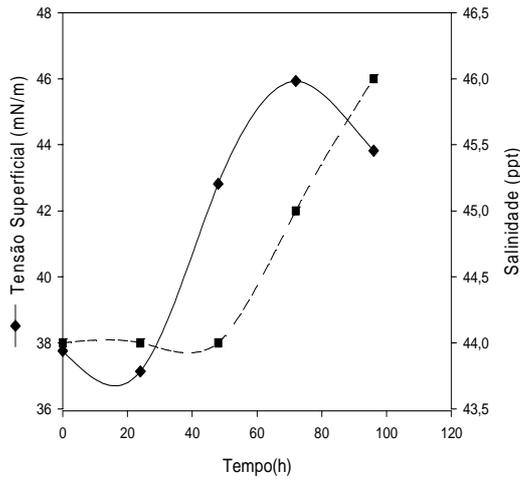
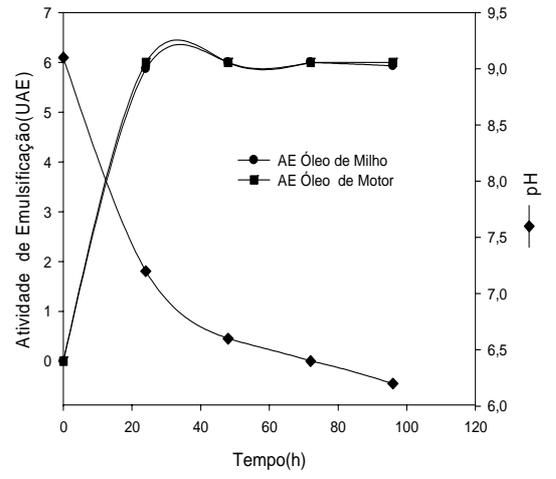


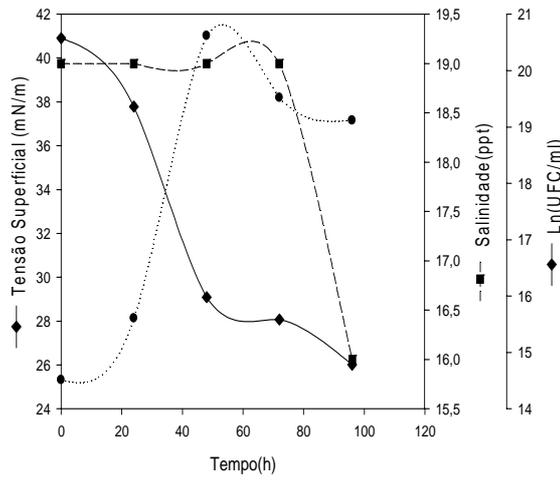
Figura 13.



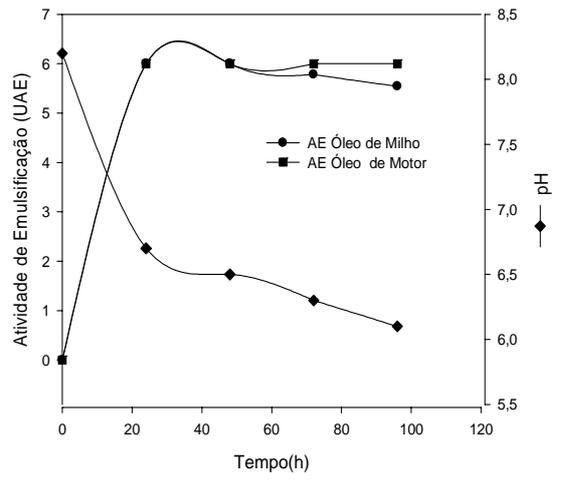
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 14

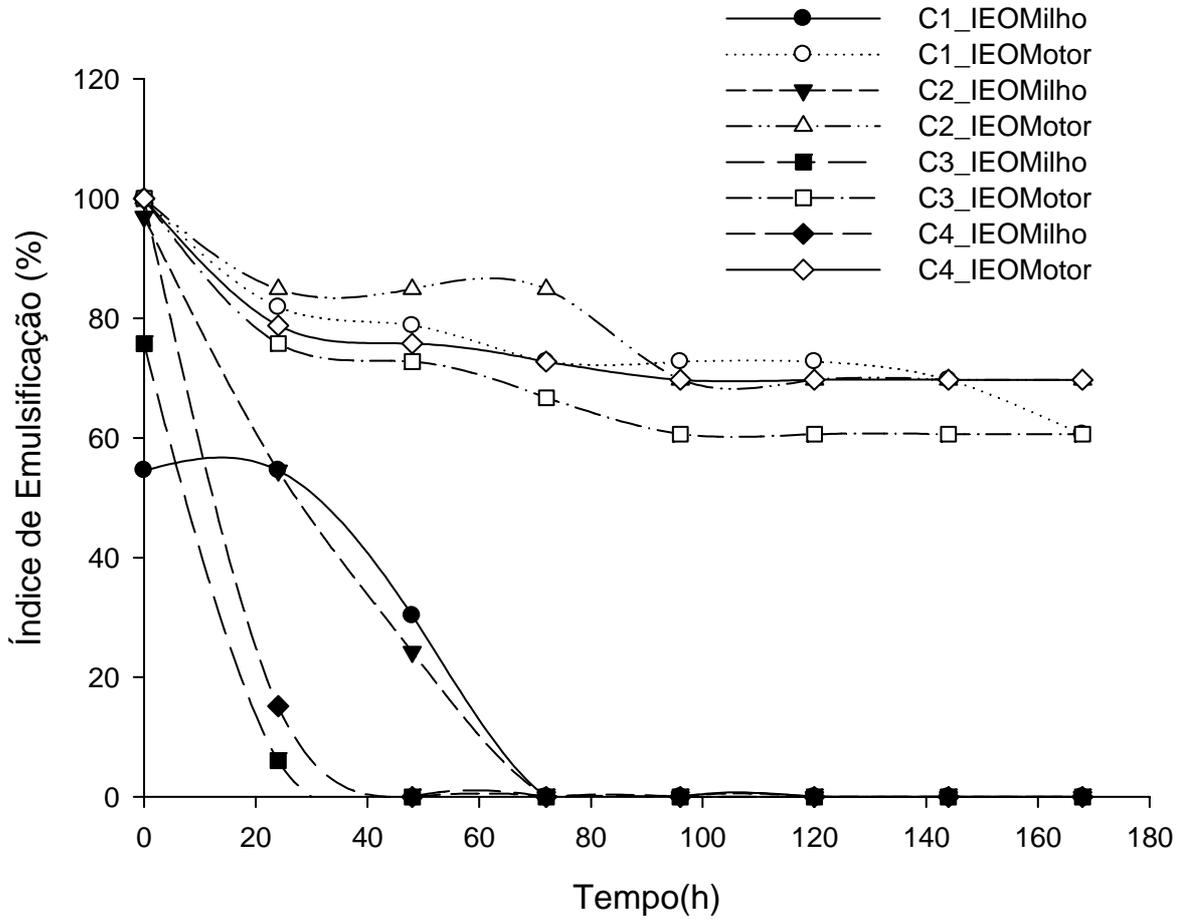


Figura 15.

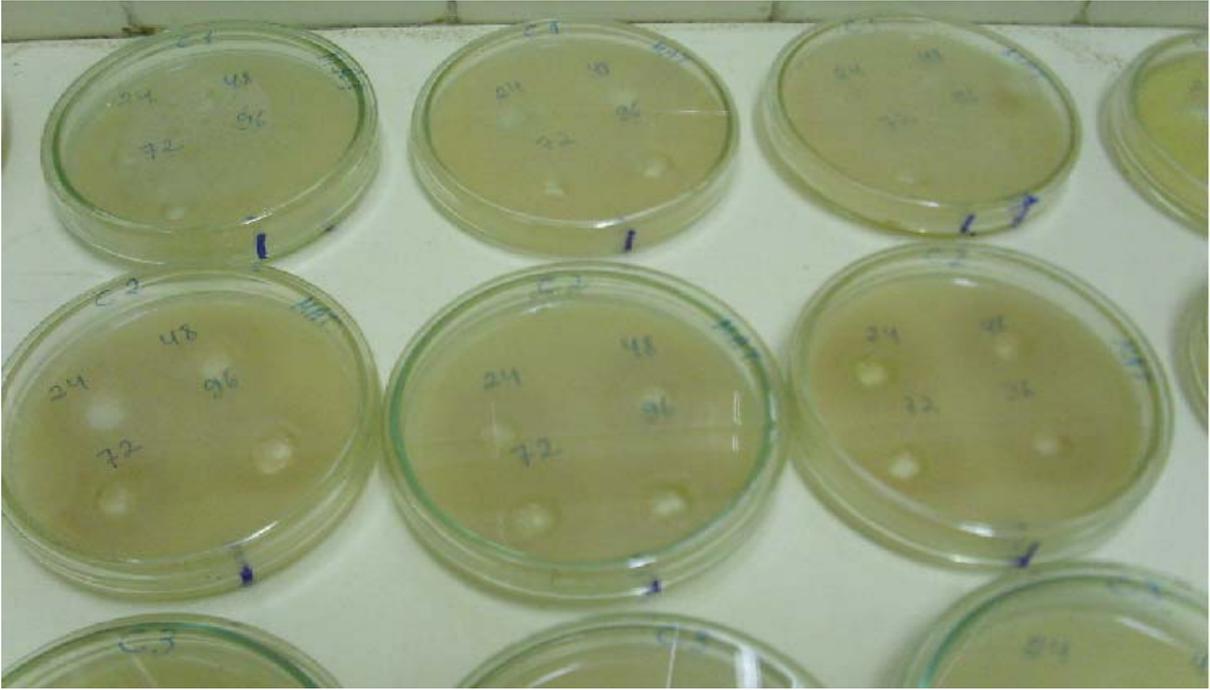


Figura 16.

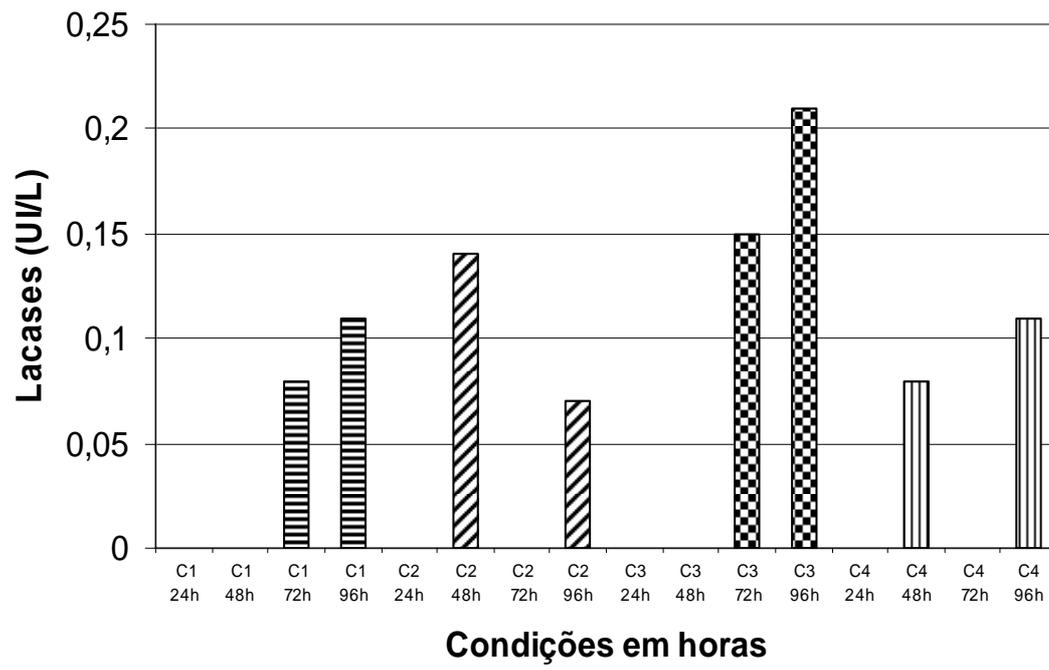


Figura 17.

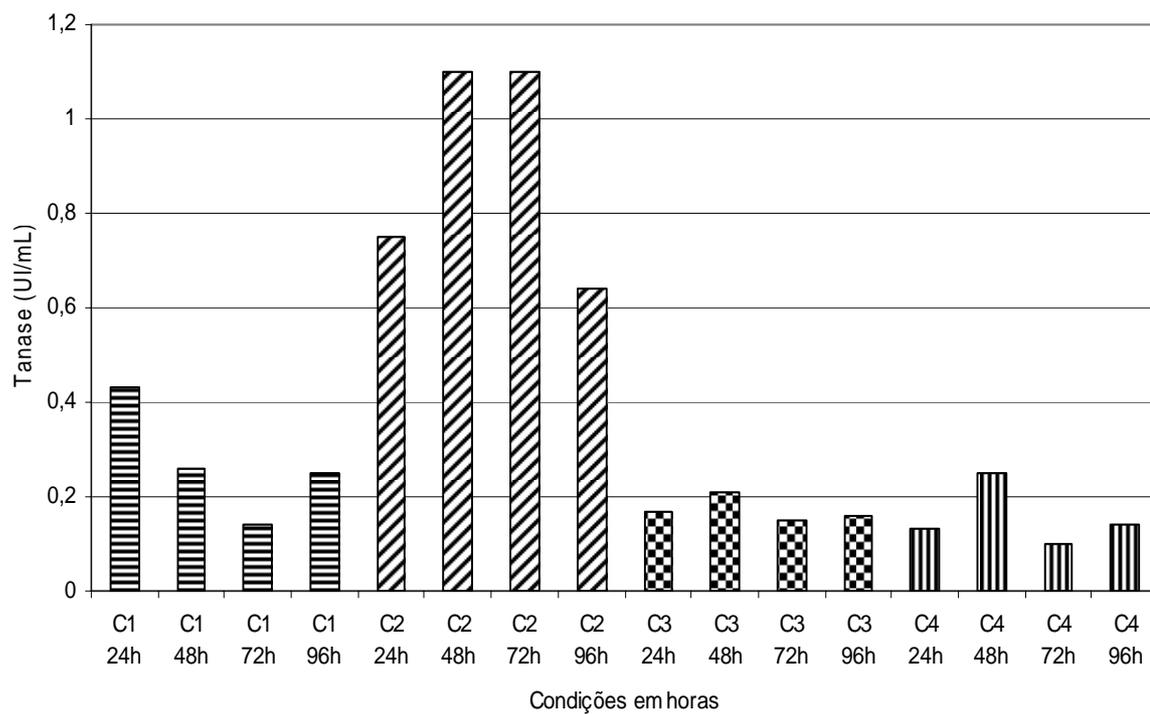


Figura 18.

## CONCLUSÕES GERAIS

As principais conclusões decorrentes deste estudo são:

- A levedura *C. lipolytica* UCP 988 é capaz de, em pH apropriado, degradar óleo diesel em água do mar natural suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo e produzir bioemulsificantes/biossurfactantes e enzimas com potencial de uso em biorremediação.
- A água do mar natural suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo é um meio eficiente e de baixo custo para produção de bioemulsificantes/biossurfactantes;
- Altas atividades de emulsificação não estão necessariamente correlacionadas com baixos valores de tensão superficial.