



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

FABÍOLA CAROLINA GOMES DE ALMEIDA

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR
Bacillus licheniformis UTILIZANDO REJEITO DO
ABACAXI (*Ananas comosus* L.) COMO FONTE
RENOVÁVEL E DE BAIXO CUSTO**

Recife

Março, 2009

FABÍOLA CAROLINA GOMES DE ALMEIDA

**PRODUÇÃO DE BIODISSURFACTANTE POR
Bacillus licheniformis UTILIZANDO REJEITO DO
ABACAXI (*Ananas comosus* L.) COMO FONTE
RENOVÁVEL E DE BAIXO CUSTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais da 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

Orientadora: Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

**Recife
Março, 2009**

A447p

Almeida, Fabíola Carolina Gomes de

Produção de biossurfactante por *Bacillus licheniformis* utilizando rejeito do abacaxi (*Ananas comosus L.*) como fonte renovável e de baixo custo / Fabíola Carolina Gomes de Almeida ; orientador Galba Maria de Campos Takaki, 2010.

71 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2010.

1. Biorremediação. 2. Biossurfactantes. 3. *Bacillus licheniformis*. 4. Abacaxi. I. Título.

CDU 574.6

**PRODUÇÃO DE BIODERIVADO POR *Bacillus*
licheniformis UTILIZANDO REJEITO DO ABACAXI (*Ananas
comosus* L.) COMO FONTE RENOVÁVEL E DE BAIXO CUSTO**

Fabíola Carolina Gomes da Almeida

Examinadores:

Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Kaoru Okada
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

Prof^a. Dr^a. Thayza Stamford Montenegro
Universidade Federal de Paraíba - UFPB

Defendida em: 26 de março de 2009

Coordenador:

Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki

**Dedico aos meus pais e à
minha querida família por sempre acreditar em mim.**

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pela força do Espírito Santo e por ter me permitido concluir mais uma etapa profissional;

À minha família, pelo incentivo e compreensão e em especial, meu pai Severino Humberto de Almeida, minha mãe Jacira Gomes da Silva, meus irmãos Fabiana Laura de Almeida e Flávio Humberto da Almeida e meu cunhado Moacir Bezerra Godoy pelo apoio em todos os momentos;

Á minha orientadora Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki pela oportunidade do meu crescimento profissional, apoio, carinho, amizade, incentivo, ensinamentos e por sempre acreditar em mim.

Ao Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, Prof. Dr. Pedro Rubens Ferreira Oliveira, S.J., por estar preocupado com a formação de recursos humanos, oferecendo ensino de qualidade;

Aos meus grandes amigos Josias Vieira, Marcio Souza, Douglas Araújo, Anne Cyslayne Nunes, Itainá Manuela da Silva, Flávia Santiago, Geovanna Albuquerque, Sônia Maria de Souza, Carol Fittipalde e Rosileide Fontenele pela amizade, pelo incentivo e apoio;

Aos Professores Dr. Elias Tambourgi, Dr. Flávio Vasconcelos e, todos os alunos do Laboratório de Química do Instituto de Química da UNICAMP, pelo apoio dado na UNICAMP;

Aos funcionários da Universidade Católica de Pernambuco em especial Cristiano, Alexandre e Jorge pelo carinho e incentivo;

Aos professores do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais Profa. Dra. Alexandra Amorim Salgueiro, Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva, Profa. Dra. Kaoru Okada e Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo, Prof. Dr. Valdemir Alexandre dos Santos e Profa. Dra. Eliane Cardoso Vasconcelos pelos ensinamentos;

Aos Professores: Prof. Dr. José Edson Gomes de Souza e Prof^a Dr^a Clarissa Daisy Costa Albuquerque, por incentivo e ensinamento;

Aos meus queridos colegas do Mestrado em Desenvolvimento de processos Ambientais, em especial as amigas Micheline Belo, Andréia Vilar e Leonila Alcyoli pelo companheirismo e amizade, construídos durante o curso;

Aos meus colegas do NPCIAMB, Marta Freitas, Fabiana América, Adriana Antunes, Patrícia Mendes, Andréia Vilar, Alicia Jara, Juliana Luna, Geisane Messias, Amanda Sales, Rodolfo Burgus, Luciana Franco, Thaysa Satmford, Thayse Alves, Flávia do Vale, Marcos Moraes, Marcos Lima, Petrusk Homero, Luiza Brito, Edinaldo Ramos, Charles Bronzo e Hélivia Casullo, em especial, Raquel Rufino, Rosileide Fontenele, Micheline Belo e Jupiranan Ferreira pela grande amizade, companheirismo e apoio nos momentos difíceis;

Aos funcionários Sônia Maria de Souza, secretária do Núcleo e auxiliar técnico Salatiel Joaquim de Santana, André Felipe Santos Lima, pela presteza, eficiência e apoio em todos os momentos;

A CAPES pela concessão da bolsa para realização do intercâmbio com a UNICAMP; A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	15
1.1 Introdução	16
1.2 Objetivo	19
Objetivo Geral	19
Objetivos Específicos	19
1.3 Revisões da Literatura	20
1.3.1 Biossurfactantes	20
1.3.1.1 Classificação dos biossurfactantes e Microrganismos produtores	21
1.3.1.2 Propriedades e vantagens do biossurfactante	24
1.3.1.3 Aplicações	28
1.3.2 Utilização de substratos solúveis e insolúveis na produção de biossurfactantes	30
1.3.2.1 Ananas comosus (L.) (abacaxi) como substrato	
Natural	33
1.3.3 Contaminação Ambiental por hidrocarbonetos	36
1.3.4 Biorremediação	37
1.3.4.1 Utilização de biossurfactantes na biorremediação de solos	38
1.4 Referências Bibliográficas	42
CAPITULO 2	48
Resumo	50
Introdução	51
2. Material e Métodos	53
2.2 Material	53
2.1.1 Microrganismo	53
2.1.2 Substratos	53
2.1.3 Solo arenoso	54
2.2 Métodos	54
2.2.1 Preparação do meio de casaca do abacaxi	54
2.2.2 Teste de atividade hemolítica	54

2.2.3	Teste de biodegradação do diesel e querosene	54
2.2.4	Condições culturais de crescimento e produção do biossurfactante	55
2.2.4.1	Crescimento bacteriano	55
2.2.4.2	Determinação do pH	55
2.2.4.2	Determinação do índice emulsificação (IE24)	55
2.2.4.4	Tensão Superficial	56
2.2.4.5	Determinação da Estabilidade do Biossurfactante	56
2.2.5	Extração e Isolamento do Biossurfactante	56
2.2.6	Composição química do biossurfactante	56
2.2.7	Remoção de petróleo e óleo queimado de motor	57
2.2.8	Fitotoxicidade (teste de Germinação)	57
3.	Resultados e Discussões	58
3.1	Detecções da produção de biossurfactante por <i>Bacillus licheniformis</i>	58
3.2	Crescimento e produção do biossurfactante por <i>Bacillus licheniformis</i>	59
3.3	Estabilidades do biossurfactante produzido com a suplementação de 5% de diesel	63
3.4	Remedições, estrutura preliminar e fitotoxicidade do biossurfactante produzido por <i>Bacillus licheniformis</i> em meio alternativo	64
3.5	Aplicações do biossurfactante na remediação de petróleo e óleo queimado de motor	66
4.	Conclusões	67
	Agradecimentos	67
	Referências	68

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 Estruturas de alguns biossurfactantes: (a) Estrutura soforolipídeos, (b) Estrutura ramnolipídeos, (c) Estrutura surfactina, (d) Estrutura emulsans, (e) Estrutura trealolipídeos (MUTHUSAMY et al., 2008). 21
- Figura 2 Ilustração das forças intermoleculares no interior e na superfície de um líquido (BANAT et al., 2000). 23
- Figura 3 Formas supramoleculares dos biossurfactantes (NITSCHKE et al., 2002). 25
- Figura 4 Tensão Superficial, interfacial e solubilização em função da concentração de surfactante (MULLIGAN, 2005). 26
- Figura 5 Fruto do abacaxi (*Ananas comosus*) e o cultivar. 33

CAPITULO 2

- Figura 1 Colônia do *Bacillus licheniformis* UCP1016 em meio Agar sangue demonstrado halo de hemólise ao redor da colônia, após 24 horas de crescimento, à temperatura de 37°C: (a) controle-(sem microrganismo), (b) colônia do *B.licheniformis*. 58
- Figura 2 Perfil de crescimento de *Bacillus licheniformis* frente óleo diesel e querosene (10- 5%) e pH da fermentação no meio natural com casca de abacaxi (*Ananas comosus* L.) durante 72h de fermentação 60
- Figura 3 Cinética da tensão superficial demonstrando a produção de biossurfactante por *Bacillus licheniformis*, na condição selecionada, meio de caldo de casca de abacaxi, suplementado com óleo diesel (5%), em 72h 58

Figura 4 Deteminação da estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus licheniformis* em meio alternativo (casca de abacaxi, suplementado com óleo diesel (5%), em 72h. A=Efeito de diferentes pH, B= Efeito de concentrações de NaCl e C= Efeito de diferentes temperaturas

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1

Tabela 1	Principais classes de biossurfactantes e microrganismos investigados (MATHUSAMY et al., 2008).	22
Tabela 2	Propriedades dos principais biossurfactates (BANAT et al., 2000)	24
Tabela 3	Função e aplicação dos biossurfactantes (MATHUSAMY et al., 2008).	28
Tabela 4	Estudos recentes da produção de biossurfactantes por microrganismos em diversos substratos (MUTHUSAMY et al., 2008).	31
Tabela 5	Teor de nutrientes da casaca do abacaxi (<i>Ananas comosus</i> L.), (GONDIM et al., 2005).	34
Tabela 6	Teor de nutrientes da parte comestível do abacaxi (<i>Ananas comosus</i> L.) (GONDIM et al., 2005).	35
Tabela 7	Ilustração das diversas possibilidades de aplicações dos biossurfactantes (ADAPTADA SINGH et al., 2007).	39
Tabela 8	Efeito da adição de biossurfactantes na recuperação de óleo (MEOR) em escala laboratorial (MULLER-HURTING et al., 1993).	40

CAPITULO 2

Tabela 1	Teor de nutrientes da casaca do abacaxi (<i>Ananas comosus</i> L.).	52
Tabela 2	Deteccção da degradação do diesel e do querosene (5 e 10%) por <i>Bacillus licheniformis</i> no período de 72h.	50
Tabela 3	Cinética de crescimento de <i>Bacillus licheniformis</i> no meio natural com resíduo (casca) de abacaxi (<i>Ananás comosus</i> L.), suplementado com óleo diesel (5 e 10%) e querosene (5 e 10%) durante 72h de fermentação.	60
Tabela 4	Cinética de produção de biossurfactante por <i>Bacillus licheniformis</i> no meio natural com casca de abacaxi (<i>Ananas comosus</i> L.), suplementado com óleo diesel (5 e 10%) e querosene (5 e 10%) durante 72h de fermentação .	61

Tabela 5	Índice de Emulsificação (E_{24} -%) do biossurfactante produzido por <i>Bacillus licheniformis</i> no meio natural com casca de abacaxi (<i>Ananas comosus</i> L.), da condição selecionada suplementação com óleo diesel (5%), com 72h de fermentação	62
Tabela 6	Rendimento obtido no isolamento do biossurfactante produzido por <i>Bacillus licheniformis</i> no meio de cascas de abacaxi, controle e adicionado de 5% de óleo diesel, como substrato.	65
Tabela 7	Teste de fitotoxicidade do biossurfactante produzido pelo <i>Bacillus licheniformis</i> em meio alternativo (caldo de cascas de abacaxi), suplementado com óleo diesel a 5%, utilizando repolho (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i>), avaliando Média de germinação da semente (G%), Média do crescimento da raiz (CR%) e Índice de germinação (G%)	66

LISTA DE ABREVIATURAS

CMC	Concentração micelar crítica
CMD	Diluição da concentração micelar
μ_{\max}	Velocidade máxima de crescimento
HPAs	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

RESUMO

Os biossurfactantes são substâncias que podem apresentar características tensoativas, sendo denominadas de biossurfactantes, as quais podem ser produzidas por bactérias e fungos quando cultivados em diferentes fontes de carbono como resultado de seu metabolismo. No presente trabalho foi investigado o potencial biotecnológico de *Bacillus licheniformis* UCP 1016, bactéria isolada de solo do Porto do Recife contaminado por petróleo, na produção de biossurfactante utilizando a casa de abacaxi (*Ananas comosus* L.), como meio alternativo. Ensaios iniciais foram realizados para avaliar a produção de bioemulsificante pela detecção da atividade hemolítica e degradação do diesel e querosene. A partir desses resultados, estudos foram realizados com a produção do bioemulsificante no meio de abacaxi controle e com diferentes concentrações dos substratos hidrofóbicos (diesel e querosene a 5 e 10%), como suplementos. Os frascos foram incubados à temperatura de 35°C, 150rpm, durante 72 horas, avaliando a cinética de crescimento, índice de emulsificação e tensão superficial. Com a melhor condição de obtenção do bioemulsificante foi utilizado o líquido metabólico livre de células foi utilizado para realizar a remoção do petróleo e óleo motor, como também os testes de estabilidade e fitotoxicidade. Os resultados iniciais com o *B. licheniformis* demonstraram atividade hemolítica e habilidade para crescer novo meio formulado com casca de abacaxi ($9,5 \times 10^6$ UFC/mL), como também com os suplementos diesel ($9,8 \times 10^6$ UFC/mL) e querosene ($8,0 \times 10^5$ UFC/mL), com 72 h de cultivo. A menor tensão superficial apresentou uma redução de $57,73 \pm 0,15$ mN/m para $38,32 \pm 0,16$ mN/m, no meio de produção contendo 5% de diesel. Os testes de estabilidade demonstraram que o bioemulsificante foi estável em pH 2 e 4, em 8% de NaCl e ausência de toxicidade. O líquido metabólico livre de células foi capaz de remover 95,15% do petróleo e 85,55% do óleo queimado de motor, respectivamente. Os resultados obtidos sugerem a formulação de um meio alternativo e de baixo custo para a produção de bioemulsificante. A bactéria *B. licheniformis* mostrou ser um microrganismo promissor, com potencial para aplicação nos processos de biorremediação.

Palavras-Chave: Bioemulsificante; *Bacillus licheniformis*; Remoção de petróleo e óleo queimado motor.

ABSTRACT

The biosurfactant are substances that showing surfactant characteristics, and denominated by biosurfactant, which can be produced by bacteria and fungi when grown in different carbon sources, as a result of their metabolism. In this work was investigated the biotechnological potential of *Bacillus licheniformis* 1016 UCP, bacterium isolated from soil contaminated by oil of the Port of Recife, the production of biosurfactant using the pineapple (*Ananas comosus* L.) peels as alternative medium. Initial tests were performed to evaluate the production of biosurfactant using the detection test to hemolytic activity and degradation of diesel and kerosene. From these results, studies were carried out using pineapple peel medium for the production of biosurfactant control and added of different concentrations of hydrophobic substrates (diesel and kerosene to 5 and 10%) as supplements. The Erlenmeyer's flasks were incubated at a temperature of 35°C, 150rpm, for 72h, evaluating the kinetics of growth, rate of emulsification and surface tension. The best condition for obtaining a biosurfactant was used for obtention of metabolic net-free cells was used to perform the removal of oil and motor oil, and the tests of stability and phytotoxicity. The results with the *B. licheniformis* showed hemolytic activity and ability to grow a new medium of pineapple peel (9.5×10^6 CFU/mL), as well as supplements diesel (9.8×10^6 CFU/mL) and kerosene (8.0×10^5 CFU/mL) with 72 h of cultivation. The lower surface tension showed a reduction of 57.73 ± 0.15 mN/m to 38.32 ± 0.16 mN/m in the production containing 5% of diesel. The stability tests showed that biosurfactant was stable at pH 2 and 4 in 8% NaCl and no toxicity. The net metabolic free cell was able to remove 95,15% and 85,55% for the burnt engine oil and petrol, respectively. The isolated, purified and characterized biosurfactant showed the presence of protein and lipids, its chemical composition. The results suggest the formulation of new medium as alternative and low cost to biosurfactant production. The bacterium *B. licheniformis* was shown to be a promising microorganism with potential for bioremediation processes.

Key words: Bioemulsificant, *Bacillus licheniformis*; Removal of oil and motor oil burned.