

## AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS LEVEDURAS *Candida guilliermondii* E *Debaryomyces hansenii* VISANDO A PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE TENSOATIVOS

Willyan Araújo da Costa<sup>1\*</sup>, Andressa Lais Maria de Melo<sup>1</sup>, Renata Kelly Pereira da Silva<sup>1</sup>, Andréa Almeida de Farias<sup>2</sup>, Sharline Florentino de Melo Santos<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química.-  
[willyam\\_wizard@hotmail.com](mailto:willyam_wizard@hotmail.com) \*

<sup>2</sup> Universidade Federal da Paraíba, Centro de Biotecnologia, Departamento de Biotecnologia .

### RESUMO

Os tensoativos são substâncias que possuem como principal característica a capacidade de atenuar as tensões superficiais existentes entre interfaces fluidas. Na indústria petrolífera são amplamente utilizados nos processos de recuperação avançada de petróleo. A rota de obtenção de tais compostos por via biotecnológica tem se mostrado uma alternativa bastante viável tendo em vista que os produtos gerados são menos agressivos ao meio ambiente e possuem boa estabilidade termodinâmica. O presente trabalho avaliou o crescimento das leveduras *Candida guilliermondii* e *Debaryomyces hansenii* objetivando a aplicação das mesmas como produtoras de substâncias superficialmente ativas, apresentando como respostas as seguintes velocidades específicas de crescimento, respectivamente: 0,119 h<sup>-1</sup> e 0,0508 h<sup>-1</sup>. Os melhores resultados de emulsificação foram para o óleo de motor, sendo os mesmos de 78,75% para a *Candida* e 76,46% para a *Debaryomyces*.

**Palavras-chave:** Tensoativos, Rota Biotecnológica, *Candida guilliermondii*, *Debaryomyces hansenii*, Índice de emulsificação.

### 1. INTRODUÇÃO

As moléculas que possuem atividade tensoativa, comumente denominadas de agentes surfactantes, recebem essa denominação devido à capacidade que as mesmas possuem de atenuar as tensões superficiais existentes na região interfacial situada entre duas fases fluidas que apresentem diferentes perfis de polaridade.

A capacidade de atenuação de tensões superficiais está associada à própria estruturação e composição desses compostos, os mesmos apresentam uma porção estrutural com caráter apolar, longa cadeia de hidrocarbonetos que pode assumir diferentes

configurações e arranjos, e outra polar, geralmente formada por um átomo que possua uma densidade de carga acentuada, que pode ser tanto negativa quanto positiva. Esses dois fatos em conjunto são responsáveis por conferir o caráter anfifílico apresentado por esses compostos [DALVIN, 2012].

Na indústria petrolífera, os agentes surfactantes possuem uma aplicação bastante relevante tendo em vista que os mesmos são empregados no processo de recuperação avançada do petróleo. Esse procedimento é categorizado como um método químico uma vez que a afinidade química existente entre o tensoativo injetado e o fluido do reservatório é o fator limitante para a operação. Segundo

Curbelo [2006], esse método é bastante promissor tomando como base o fato de que os agentes superficialmente ativos conseguem mitigar as tensões na interface do óleo produzido e da água, fazendo com que as eficiências de deslocamento e de varrido sejam potencializadas.

A obtenção de tais moléculas apresenta como principal rota sintética, a via química. Porém, uma tendência bastante investigada e que atualmente tem se mostrado bastante promissora é a rota biotecnológica. Os processos biotecnológicos para obtenção de tensoativos levam em consideração a capacidade que muitos microrganismos possuem de, ao metabolizarem moléculas orgânicas, produzirem e excretarem em seu meio de crescimento moléculas com propriedades minimizadoras de tensões superficiais. O produto de tais bioprocessos é denominado na literatura de biossurfactantes [ARAÚJO; FREIRE, 2013].

Existem inúmeras vantagens que tornam a aplicação dos biossurfactantes uma prática mais proeminente frente à utilização dos tensoativos químicos. Do ponto de vista industrial, podem-se destacar como vantagens, além da atividade superficial e interfacial, as seguintes características: tolerância à temperatura, pH e força iônica, biodegradabilidade e baixa toxicidade [NITSCHKE, 2012].

Do ponto de vista microbiológico, pode-se mencionar como vantagem, o fato de haver uma diversidade de microrganismos capazes de sintetizar tais compostos, pois essa capacidade é inerente aos mecanismos de adaptação dos mesmos. As leveduras têm se mostrados agentes promissores na produção de compostos emulsificantes [FONTES; AMARAL; COELHO, 2008].

O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de produção de substâncias tensoativas pelos microrganismos *Candida guilliermondii* e *Debaryomyces hansenii* através da determinação dos parâmetros da cinética de crescimento e das respostas geradas pelos índices de emulsificação obtidos.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram as leveduras *Candida guilliermondii* e *Debaryomyces hansenii*. As culturas foram mantidas em meio Yast Malt Agar (Y.M.A), composto por glicose 1% (m/V), extrato de levedura 0,3% (m/V), peptona 0,5% (m/V), extrato de malte 0,3% (m/V) e agar 2% (m/V), a 4°C.

O inóculo foi preparado colocando-se três alçadas da cepa em um erlenmeyer de 50 mL contendo 25 mL do meio de cultivo proposto por Santa Anna [2001], o qual é constituído

por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3 g/L),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (7 g/L),  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  (1 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2 g/L), e glicose (40 g/L). A incubação foi realizada em mesa agitadora a 30°C e 200 rpm por 24h.

## 2.2 Produção biotecnológica de Tensoativos

A produção biotecnológica de tensoativos foi realizada em frascos erlenmeyer de 500 mL contendo 225 mL do mesmo meio utilizado no inóculo. O conjunto foi então esterilizado por 15 min, 1atm e 111°C. Em seguida, o meio foi inoculado com uma concentração de células de 10% (V/V). O crescimento das leveduras foi monitorado por 96 h em mesa rotatória a 200 rpm e temperatura de 30°C. Foram retiradas alíquotas do meio em diferentes intervalos de tempo para a análise de crescimento celular, consumo de substrato e, ao término do cultivo, para a verificação dos índices de emulsificação. Os ensaios foram realizados em duplicata.

## 2.3 Análises

### 2.3.1 Crescimento microbiano

Para realizar o monitoramento do crescimento dos microrganismos foi utilizado o método de turbidimetria, onde a concentração de biomassa foi quantificada através de uma curva de calibração que correlacionava a absorbância do meio, a um

comprimento de onda de 600 nm, com uma respectiva concentração celular dada em g/L.

### 2.3.2 Açúcares redutores

Para acompanhar o consumo de substrato, açúcares redutores, ao longo cultivo, utilizou-se o método do 3,5- Dinitrossalicilato (DNS), proposto primeiramente por Miller [1959] e posteriormente adaptado por Vasconcelos [2013] da Embrapa Agroindústria Tropical.

### 2.3.3 Índice de emulsificação

Os índices de emulsificação foram obtidos através da agitação em vórtex de 2 mL do meio de cultura, para 0 e 96 h de cultivo, com 2 mL de óleo soja ou óleo de motor, por 2 minutos. O índice de emulsificação corresponde à razão entre a altura da emulsão e a altura total de líquido. Dado pela seguinte equação:

$$IE(\%) = \frac{H_{FE}}{H_{Total}} \times 100 \quad [1]$$

## 2.4 Obtenção dos parâmetros da cinética de crescimento

A obtenção dos parâmetros da cinética de crescimento foi realizada seguindo o proposto por Schmidell et al. [2001].

### 2.4.1 Produtividade em biomassa



Tal parâmetro é uma expressão da velocidade média do crescimento microbiano, onde verifica-se a relação estabelecida pela razão entre a biomassa produzida e o tempo total de cultivo. Onde, para expressão abaixo,  $X$  é a concentração final de células e  $X_0$  equivale à concentração inicial.

$$P_x = \frac{(X - X_0)}{\text{Tempo de cultivo}} \quad [2]$$

#### 2.4.2 Velocidade específica de crescimento máxima

A velocidade específica de crescimento tem seu valor máximo na fase exponencial da curva de crescimento, onde a atuação metabólica dos microrganismos se dá de forma mais enfática e acentuada. Essa velocidade corresponde à inclinação da reta obtida pelo gráfico do  $\ln(X)$  versus  $t$  (tempo de cultivo), onde  $X$  são os valores da concentração microbiana na fase já mencionada. A equação linearizada é a seguinte:

$$\ln(X) = \mu(T - T_i) + \ln(X_i) \quad [3]$$

#### 2.4.3 Tempo de Geração

A determinação do tempo de geração permite mensurar quanto tempo o metabolismo microbiano necessita para dobrar sua concentração de células inicial. Dado pela seguinte expressão:

$$T_g = \frac{\ln(2)}{\mu_{\text{máximo}}} \quad [4]$$

#### 2.4.4 Fator de conversão de substrato em biomassa

Mede a correlação existente entre a quantidade de biomassa produzida e o teor de substrato consumido, mensurando assim a influência de um sobre o outro. Dado pela expressão a seguir, onde  $S_0$  é a concentração final de substrato e  $S$  é a concentração inicial.

$$Y_{x/s} = \frac{(X - X_0)}{(S_0 - S)} \quad [5]$$

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A determinação do crescimento celular se deu por turbidimetria, onde uma curva de calibração foi obtida verificando-se, por peso seco, a quantidade de biomassa produzida pra o tempo de cultivo total, 96h e então diluindo-se essa concentração na seguinte ordem: 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 e 1:60. As absorbâncias foram medidas a 600nm. Gerou-se então uma modelo linear que correlaciona a absorbância medida a uma concentração de células em g/L. Sendo o mesmo, para cada um dos cultivos:

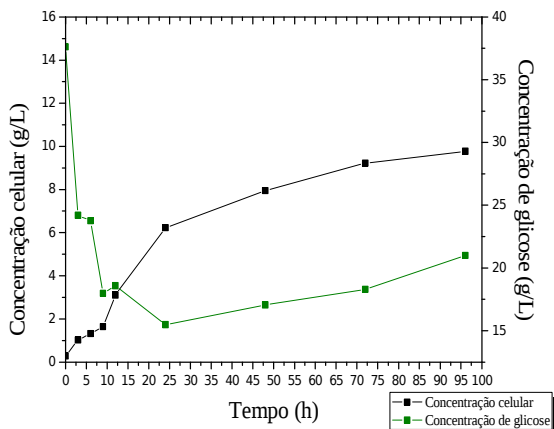
Tabela 1: Modelos lineares de calibração

Microrganismos	Modelo linear	Coefficiente de correlação
<i>Candida guilliermondii</i>	$y = 1,2788x - 0,4716$	0,9863
<i>Debaryomyces hansenii</i>	$y = 0,9367x - 0,1232$	0,9907

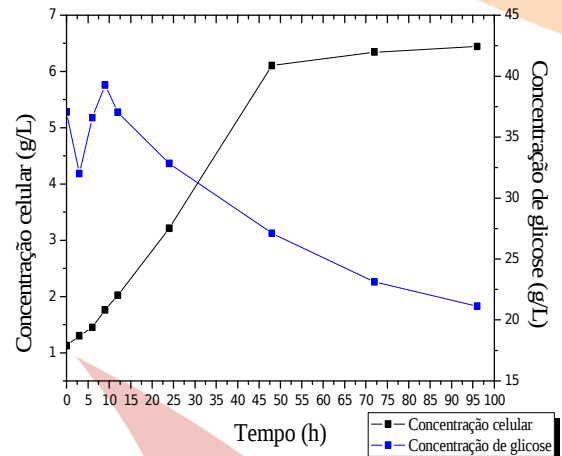


Como mostrado na tabela acima, os modelos gerados para a curva de calibração de cada cultivo, apresentaram um coeficiente de correlação superior a 0,98, o que assegura uma boa representatividade para os mesmos pois há 98% de explicação das possíveis variações entre os valores obtidos pelo mesmo e os reais.

Com os dados da produção de biomassa e de consumo de substrato obtidos ao longo da execução do bioprocessamento, foram montadas as curvas de crescimento celular e de decréscimo da concentração da fonte de carbono para cada cultivo. Sendo as mesmas:



**Figura 1 – Curva de crescimento celular e consumo de substrato para a *Candida guilliermondii* para um tempo de cultivo de 96h.**



**Figura 2 – Curva de crescimento celular e consumo de substrato para a *Debaryomyces hansenii* para um tempo de cultivo de 96h.**

A adaptação do microrganismo, em ambos os casos foi de aproximadamente 3 h, já a fase exponencial prosseguiu até 12 h.

**Tabela 2 – Parâmetros cinéticos**

Microrganismo	$\mu_{máximo}$ (h <sup>-1</sup> )	Tg (h)	Y <sub>x/s</sub>
<i>Candida guilliermondii</i>	0,119	5,82	0,57
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0,0508	13,64	0,33

A produtividade em biomassa para a *Candida guilliermondii* e para a *Debaryomyces hansenii*, respectivamente foram iguais a 0,098 e 0,055 g. L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, tendo em vista que o tempo final do cultivo foi de 96 horas.

Silva [2011] encontrou um valor de velocidade específica para a *Debaryomyces* equivalente a 0,062 h<sup>-1</sup>. Para a *Candida*, foi

encontrado por Felipe et al. [2003], uma conformidade com todos os parâmetros obtidos para o cultivo realizado nesse presente trabalho.

Os resultados para o índice de emulsificação em óleo de soja e óleo de motor são mostrados nos gráficos a seguir:

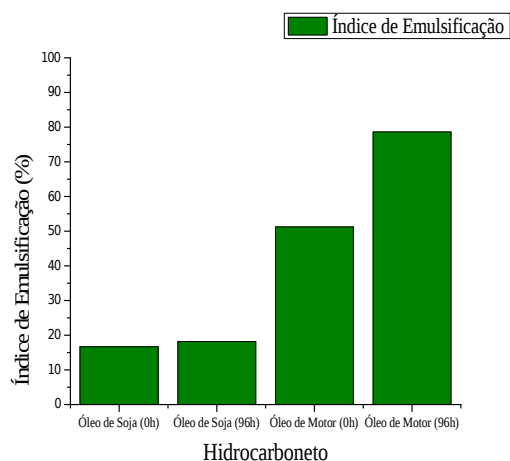


Figura 3 - Índices de emulsificação obtidos para diferentes óleos com o meio livre de células (*Candida guilliermondii*).

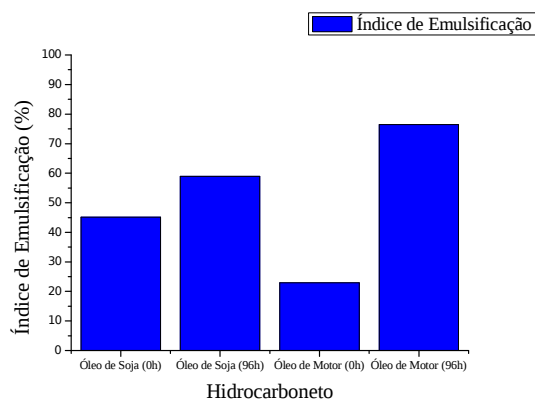


Figura 4 - Índices de emulsificação obtidos para diferentes óleos com o meio livre de células (*Debaryomyces hansenii*).

Tendo em vista que a avaliação do índice de emulsificação é uma medida indireta das substâncias tensoativas que foram geradas durante o bioprocessamento, pode-se constatar que

ambos os microrganismos se mostraram eficientes, tendo em vista que o melhor valor encontrado foi de cerca de 76% para o óleo de motor, em ambos os casos. Brasileiro [2013] obteve um percentual de emulsão de 100% para óleo de motor utilizando a *Candida guilliermondii*, para um tempo de cultivo de 114 h, com uma composição de meio diferente da utilizada nesse trabalho, o que justifica as discrepâncias. A produção de biossurfactantes por *Debaryomyces hansenii* ainda não está bem fundamentada e disseminada pela literatura especializada.

#### 4. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, foi possível avaliar o potencial por trás da rota de síntese biotecnológica de agentes tensoativos mostrando que a *Candida guilliermondii* e a *Debaryomyces hansenii* se configuraram como agentes proeminentes para essa finalidade. Melhorias no meio de cultura precisam ser estudadas com o intuito de otimizar as taxas de crescimento de ambos os microrganismos, inclusive por meio da alteração da fonte de carbono, glicose, por resíduos que venham a diminuir os custos atrelados à condução desse bioprocessamento.

## 5. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, L. V. de.; FREIRE, D. M. G.

**Biossurfactantes: Propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrogiana.** Química Nova, v. 36, n. 6, p. 848-858, 2013.

BRASILEIRO, P. P. F.; ROQUE, B. A. C.; DURVAL, I. J. B.; da ROCHA e SILVA, N. M. P.; da ROCHA e SILVA, F. C. P.; SOARES da SILVA, R. C. F.; dos SANTOS, D. K. F.; de LUNA, J. M.; RUFINO, D. R.; SARUBBO, L. A.; dos SANTOS, V.A. **Aumento de escala, estudo da estabilidade e estimativa dos custos de manutenção do Biossurfactante produzido por Candida guilliermondii.** In: Congresso brasileiro de Engenharia Química, 20., 2014, Florianópolis, Anais de evento. São Paulo: Blucher proceedings, 2014.

CURBELO, F. D. S. **Recuperação avançada de petróleo utilizando tensoativos.** Março 2006. 196 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Programa de pós graduação em Engenharia Química. Rio Grande do Norte, 2006.

DALTIN, D. **Tensoativos. In: Tensoativos: Química, propriedades e aplicações.** São Paulo: Blucher, 2011. P.11-35.

FELIPE, M. G.; HAULY, M. C. O.; CANETTIERE, E. V.; CÂNDIDO, E. J.; TAMANINI, C. **Avaliação da casca de aveia para obtenção de hidrolisado hemicelulósico e produção de xylitol por processo fermentativo.**In: Simpósio nacional de fermentações, 14., 2003, Florianópolis. Anais de evento, Florianópolis, 2003.CDROM.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F; COELHO, M. A. Z. **Produção de biossurfactante por leveduras.** Química Nova, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.

MILLER, G. L., **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar Analytical Chemistry.** 1959 31 (3), 426-428,1959.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. **Biossurfactantes: Propriedades e aplicações.** Química Nova, v. 25,n. 5, p. 772-776, 2006.

SANTA ANNA, L. M, G. V. SEBASTIAN, N. PEREIRA, JR., T. L. M. ALVES, E. P. MENEZES, D. M. G. FREIRE. **Production of biosurfactant from a new and promising strain of Pseudomonas aeruginosa PA1. Applied biochemistry and biotechnology,** v. 91, n. 1-9, p. 459-467, 2001.

SILVA, C. O. *Aproveitamento do bagaço do abacaxi (Ananas comosus L. Merrill) para produção biotecnológica de Xilitol*. 2011. Universidade Federal de Viçosa, programa de Pós-Gradua Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em ciência e tecnologia de.

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. de O. *Agro-industrial residues in biotechnological production of xylitol*. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 25, n. 4, p. 315-330, 2004.

VASONCELOS, N.M. D. *Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico: Histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos*. Fortaleza. Embrapa Agroindústria Tropical, 2013.

