

## IMOBILIZAÇÃO DE LEVEDURAS EM SUPORTES A BASE DE ALGINATO DE SÓDIO PARA APLICAÇÃO EM PROCESSOS DE DESCOLORAÇÃO DE EFLUENTES

**Ana Beatriz Costa Silva** <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Graduanda em Engenharia Sanitária e Ambiental pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. E-mail: anabiacosta.s@gmail.com

**Márcia Luciana Cazetta** <sup>(2)</sup>

<sup>(2)</sup> Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas. E-mail: malulz@yahoo.com.br

**Talita Lopes Honorato** <sup>(3)</sup>

<sup>(3)</sup> Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. E-mail: talitahonorato@ufrb.edu.br

### RESUMO

Os estudos relacionados à descoloração de corantes têxteis têm aumentado devido ao fato dessas indústrias estarem entre as mais poluentes, gerando resíduos tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos. As leveduras apresentam ação em potencial no processo de degradação de corantes, porém sua aplicação em processos industriais pode ser limitada devido às características morfológicas do microrganismo, além de entraves associados à separação do efluente tratado, gerando o incremento de operações unitárias e elevando, tanto o custo da operação, quanto as dificuldades na reutilização do microrganismo. Buscou-se, portanto, imobilizar a levedura *Candida cylindracea* SJL6 em suportes de alginato de cálcio para aplicação em processos de descoloração. Estudou-se o efeito de três concentrações de alginato de sódio (3%, 4% e 5%) para suporte na imobilização, assim como o tempo de cura (3h e 24h) na solução de cloreto de cálcio. As estruturas imobilizadas foram submetidas a ensaios de descoloração do azo corante Alaranjado G e os melhores resultados foram obtidos com 4% de alginato e 24h de tempo de cura, onde os valores atingiram taxas de descoloração de até 98%.

**PALAVRAS-CHAVE:** Azo corante, *Candida cylindracea* SJL6, Alaranjado G

### INTRODUÇÃO

As leveduras podem ser utilizadas na descoloração de efluentes devido à variedade do seu aparato enzimático, rápido crescimento e resistência a ambientes desfavoráveis. A imobilização das células microbianas surge como uma alternativa para adequar a aplicação do microrganismo tanto em escala laboratorial como em processos industriais.

As células imobilizadas têm, dentre suas diversas vantagens o incremento da estabilidade biológica das células e do produto, possibilitando a retenção, recuperação simplificada e reutilização dos microrganismos por vários ciclos de processamento, podendo ser operadas para processos contínuos de tratamento. Portanto, a perspectiva de que, ao se utilizar uma cepa de leveduras que demonstrou eficiência na descoloração e inseri-la em estratégias de imobilização, possibilitaremos o desenvolvimento de um produto com potencial de aplicação direta no tratamento de efluentes têxteis.

### OBJETIVOS

O devido artigo tem como objetivo determinar as melhores condições para imobilização de *Candida cylindracea* SJL6 com potencial para descoloração e avaliar os parâmetros bioquímicos para o processo de descoloração das células imobilizadas.

### METODOLOGIA

#### 1. MICRORGANISMO

Os fungos utilizados são do acervo de microrganismos do Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Brasil. As leveduras são de origem ambiental, isoladas de água e moluscos bivalves do Rio Subaé, flores, frutos e ninhos de formiga. A cepa selecionada com capacidade de descoloração trata-se do microrganismo *Candida cylindracea* SJL6 (ALCÂNTARA, 2014). O microrganismo selecionado é mantido estocado a 4°C até sua utilização.

## 2. SOLUÇÕES PARA IMOBILIZAÇÃO

Foram utilizadas soluções de cloreto de cálcio anidro 0,2 M, tampão acetato de sódio puro 0,02M e solução polimérica do gel de alginato de sódio nas concentrações de 3, 4 e 5% (p/v). As soluções de cloreto de cálcio, acetato de sódio e alginato de sódio foram esterilizadas em autoclave a 121°C por 15 minutos, bem como o aparato para encapsulamento da levedura.

## 3. IMOBILIZAÇÃO DE *Candida cylindracea* SJL6 UTILIZADA EM PROCESSOS DE BIODESCOLORAÇÃO AERÓBICA

Para ativação da levedura *Candida cylindracea* SJL6, estocada em placa, a cepa foi inoculada em 150 mL de Meio Normal de Descoloração (MND) modificado (RAMALHO, 2004), composto por extrato de levedura (2,5g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5g/L),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,13g/L), glicose (2%), até que sua absorbância, a 550 nm, se encontre na faixa 0,8 ( $\text{DO}_{550}=0,8$ ). Após inoculação os Erlenmeyers foram incubados em shaker a 25°C, 150 rpm, por 24h.

Após o período de incubação, o cultivo foi transferido para uma solução estéril de alginato de sódio na proporção de 1:20 (v/v, inóculo:alginato).

Na etapa de extrusão, a solução (alginato de sódio contendo *C. cylindracea*) foi gotejada através do injetor (funil de decantação) em 250 mL de solução aquosa de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,2M, à temperatura de 4°C, para a formação das estruturas imobilizadas. Posteriormente, essas estruturas imobilizadas (*pellets*) ficaram em repouso, variando seu tempo de cura entre 3h e 24h, a 4°C para fixação das estruturas.

Finalmente, os *pellets* foram lavados em tampão acetato de sódio 0,02M (pH 5) por três vezes para remoção do material solúvel e estocados a 4°C, em solução tampão, até sua utilização.

Os procedimentos de imobilização supracitados foram executados para as três concentrações de soluções poliméricas de alginato de sódio (3, 4 e 5%, p/v).

## 4. DESCOLORAÇÃO AERÓBICA UTILIZANDO AS CÉLULAS IMOBILIZADAS

Os estudos com as células imobilizadas foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL do meio MND, acrescentado da substância corante Alaranjado G. As condições de descoloração foram extraídas de um protocolo já desenvolvido e padronizado em pesquisa anterior para células livres (ALCÂNTARA, 2014), fixadas em: concentração final do corante em 200 ppm, pH 5, glicose 1%, 25°C, agitação a 150 rpm.

Foram inoculados 10% (p/v) de *pellets* em cada Erlenmeyer e os frascos foram incubados por 24h. Os procedimentos foram executados também com células livres, para permitir a comparação dos resultados.

Após os ensaios, as células imobilizadas foram separadas do meio incubado por filtração, utilizando gaze estéril. Os *pellets* foram lavados com solução tampão, para a retirada de eventuais resíduos do meio MND, e estocadas à 4°C para reuso. Para o experimento controle, contendo células livres, o meio foi centrifugado por 10 minutos a 5000 rpm. Ambos os meios, isentos de células (filtrado do procedimento experimental com leveduras imobilizadas e o sobrenadante do ensaio controle) foram utilizados para a leitura da absorbância e cálculos de taxa de descoloração. Todos os ensaios e análises foram realizados em duplicata.

## 5. MÉTODO ANALÍTICO

A taxa de descoloração foi monitorada por espectrofotometria e avaliada pela diminuição da absorbância, sendo expressa pela Equação 1.

$$\text{Descoloração (\%)} = (A-B) / A \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Onde (A) indica a absorbância do meio não inoculado e (B) indica a absorbância residual do meio.

A faixa do comprimento de onda é fixada pela absorção máxima do corante na região do visível, no caso do Alaranjado G, a 476nm. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

## 6. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ALGINATO E DO TEMPO DE CURA

A influência da concentração de alginato foi avaliada utilizando-se, para imobilização das células, três diferentes concentrações: 3, 4 e 5% p/v, para a preparação dos *pellets*. As fermentações foram conduzidas como descrito nos itens 3 e 4.

Para se avaliar o efeito do tempo de cura na descoloração, os *pellets* de alginato, após a imobilização, foram mantidos em solução aquosa de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,2M por 3 ou 24 horas, sendo posteriormente lavados por três vezes e estocados em tampão acetato de sódio puro 0,02M até sua utilização.

## RESULTADOS

Inicialmente a solução de alginato de sódio (3, 4 e 5%, p/v), contendo *Candida cylindracea* SJL6 na proporção de 1:20, foi colocada no funil de decantação a uma altura padrão, seguido por gotejamento da mistura em solução de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,2M. Durante o gotejamento o funil era desacoplado do suporte em momentos específicos para a homogeneização da solução de alginato de sódio (3, 4 e 5%, p/v) inoculada.

Após o processo de imobilização, percebeu-se diferenças de diâmetros dos *pellets* formados nas diferentes concentrações (Figura 1).

**Figura 1: *Candida cylindracea* SJL6 imobilizada com solução de alginato de sódio 5, 4 e 3% p/v gotejada por funil de decantação, em respectiva ordem.**



A partir da Equação 1, utilizando alginato de sódio 3%, tempos de cura de 3 e 24h em meio MND contendo 200 ppm de corante alaranjado G, obteve-se descoloração de 23,24% para os pellets com 3h de cura e 16,68%, com 24h de cura.

O teste de descoloração, utilizando *pellets* com 4% de alginato de sódio, no tempo de cura de 3h não obteve sucesso, confirmado pela análise dos cálculos da taxa de descoloração (0%), porém no tempo de cura de 24h a taxa de descoloração foi de 98%.

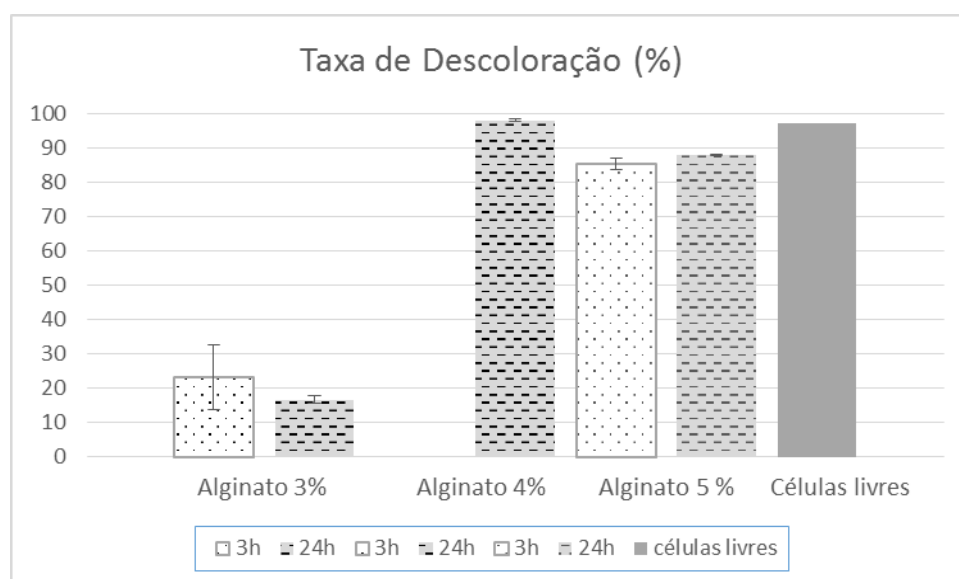
Os testes de descoloração, utilizando os *pellets* contendo alginato de sódio 5% e tempo de cura de 3 e 24h, obtiveram taxas de descoloração de 85,4% e 87,84%, respectivamente.

Os dados supracitados foram editados, compilados e os resultados comparativos são apresentados na Tabela 1 e Figura 2.

**Tabela 1: Valores médios das porcentagens das taxas de descoloração do meio MND, contendo 200ppm de corante Alaranjado G, utilizando células imobilizadas em diferentes concentrações de alginato de sódio (3, 4 e 5%, p/v) com tempos de cura 3h e 24h. Comparação entre as células de *Candida cylindracea* SJL6 imobilizadas e livres.**

Tempo de Cura (h)	Taxa de Descoloração (%)		
	Alginato 3%	Alginato 4%	Alginato 5%
3	23,24	0	85,4
24	16,68	98	87,84
Células livres	97		

**Figura 2: Valores médios das porcentagens das taxas de descoloração do meio MND, contendo 200ppm de corante Alaranjado G, utilizando células imobilizadas em diferentes concentrações de alginato de sódio (3, 4 e 5%, p/v) com tempos de cura 3h e 24h. Gráfico comparativo entre as células de *Candida cylindracea* SJL6 imobilizadas e livres.**



## DISCUSSÃO

O encapsulamento da levedura *Candida cylindracea* SJL6 em solução alginato de sódio 3, 4 e 5%, p/v, mostrou-se eficaz para imobilização das células microbianas.

Conforme TAN et. al. (2014), o microrganismo pode descolorir de duas formas, por degradação ou absorção. Por absorção, os azo corantes não são degenerados, são apenas acumulados. Como não houve acúmulo de corante nos *pellets*, pode-se afirmar que a *Candida cylindracea* SJL6 descolore por degradação.

Apesar da eficácia no procedimento de imobilização, a taxa de descoloração, utilizando células imobilizadas, foram inferiores aos resultados obtidos com células livres para os pellets contendo 3 e 5% de alginato de sódio. Porém, os *pellets* de solução alginato de sódio 4% e 24h de tempo de cura apresentaram resultados promissores, superando inclusive as taxas de descoloração das células livres de *Candida cylindracea* SJL6 em meio MND com corante Alaranjado G.

SAID, FERID, MARZOUKI (2010) atribui a boa porcentagem de descoloração às propriedades do gel alginato de sódio, que permite o encapsulamento de um grande número de células, possibilita uma ótima difusão com o meio e a sua manutenção. O aumento da taxa de descoloração de um microrganismo imobilizado, quando comparado ao ensaio com células livres, pode-se justificar devido à elevada concentração de células por área encapsulada e, como consequência, o maior número de células ocasiona um aumento de produtividade.

Os resultados encontrados para a imobilização 4% contradizem as afirmativas de SOUZA (2007), que justifica em seu trabalho que, no maior tempo de cura, as ligações entre os íons de cálcio e o polímero, ambos presentes na solução, desfavorece a difusão de nutrientes e produtos, porém corroboram os resultados encontrados na taxa de descoloração utilizando pellets com alginato de sódio 3% (p/v) nos tempos de cura entre 3 e 24h.

Para os *pellets* de alginato 5%, os resultados apresentados, apesar de menores que os encontrados para células livres, foram superiores a 80% em ambos os tempos de cura. De acordo com COVIZZI et. al. (2007), o crescimento celular depende da porosidade do material e conforme SAID, FERID, MARZOUKI (2010), a descoloração está diretamente ligada com o crescimento bacteriano. Quanto maior a concentração do alginato de sódio, menor a porosidade, resultando em menor crescimento celular dentro dos *pellets* e, portanto, menor produtividade na descoloração, o que explicaria o decaimento da taxa de descoloração na concentração de 5% de alginato de sódio.

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a imobilização de *Candida cylindracea* SJL6 utilizando alginato de sódio (3, 4 e 4% p/v) com os tempos de cura 3 e 24h foram bem sucedidos, já que os *pellets* formados permaneceram estáveis e ativos.

A partir da análise dos dados, pode-se afirmar que a condição ótima para descoloração do Alaranjado G, utilizando *Candida cylindracea* SJL6, dentre as condições testadas, é em suporte alginato de sódio 4% (p/v) com tempo de cura de 24h em solução de cloreto de cálcio 0,2M, pois a taxa de descoloração atingiu valores de 98%, superiores a todas as outras condições, incluindo a das células livres.

## REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, T. A. P. Descoloração Aeróbica do Corante Alaranjado G por *Candida cylindracea* SJL6 Isolada do Rio Subaé – Bahia. 2014. 65 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Colegiado do Programa de Pós-Graduação, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bahia.
- COVIZZI, L. G.; GIESE, H. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. Imobilização de Células Microbianas e suas Aplicações Biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 28, n.2, p. 143-160, jul./dez. 2007.
- RAMALHO, P. A.; Cardoso, M. H.; Cavaco-Paulo, A.; Ramalho, M. T. Characterization of azo reduction activity in a novel ascomycete yeast strain. *Applied and Environmental Microbiology*, Portugal, v. 70, nº 4, p. 2279-2288, 2004.
- SAID, G.; FERID, L.; MARZOUKI, M. Decolorization of an industrial effluent by free and immobilized cells of *Stenotrophomonas maltophilia* AAP56. Implementation of efficient down flow column reactor. *World J Microbiol Biotechnol*, Tunisia, v. 26, p. 1341-1347, 2010.
- SOUZA, M. C. M. Preparação de Suportes a Base de Alginato de Sódio para a Imobilização de Microrganismos Produtores de Biossurfactantes. 2007. 64 f. Monografia (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Ceará.
- TAN, L.; LI, H.; NING, S.; XU, B. Aerobic decolorization and degradation of azo dyes by suspended growing cells and immobilized cells of a newly isolated yeast *Magnusiomyces ingens* LH-F1. *Bioresource Technology*, Dalian 116024, v. 158, p. 321-328, 2014.