UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* EMPREGANDO ÓLEO DE SOJA RESIDUAL

Autor: Cristian Jacques Bolner de Lima
Orientadoras: Dra.Vicelma Luiz Cardoso
Dra. Eliana Flávia Camporese Servulo

Uberlândia - MG
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Autor: Cristian Jacques Bolner de Lima

Químico Industrial

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Uberlândia – MG

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

L732p Lima, Cristian Jacques Bolner de, 1974-
Produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* empregando óleo de soja residual / Cristian Jacques Bolner de Lima. - 2007.
168 f. : il.

Orientadoras: Vicelma Luiz Cardoso, Eliana Flávia Camporese Servulo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui bibliografia.

1. Engenharia bioqúimica - Teses. 2. Biotecnologia - Teses. 3. Biossurfactante - Teses. I. Cardoso, Vicelma Luiz. II. Servulo, Eliana Flávia Camporese. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDU: 663.1

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE CRISTIAN JACQUES BOLNER DE LIMA APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, EM 24/08/2007.

BANCA EXAMINADORA:

_____

Prof. ª Dra.Vicelma Luiz Cardoso

Orientadora (FEQUI/UFU)

_____

Prof.ª Dra. Eliana Flávia Camporese Servulo

Co- Orientadora (EQ/UFRJ)

_____

Prof. ª. Dra. Leila Peres

Professora (FEQUI/UNICAMP)

_____

Prof. Dr. Euclídes Honório de Araújo

Professor (FEQUI/UFU)

_____

Prof. ª. Dra. Miriam Maria de Resende

Professor (FEQUI/UFU)

Dedico este trabalho a minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de alcançar mais uma vitória em minha vida.

A Profª. Vicelma Luiz Cardoso pela orientação, pela total dedicação e oportunidade depositada durante esses quatro anos de trabalho.

A Profª. Eliana Flávia Camporese Sérvulo pela co-orientação, colaboração e incentivo ao longo deste projeto;

A Profª. Miriam Maria de Resende pela colaboração especial fornecida para complementação de meus resultados.

Ao Édio Alves pelo auxílio e colaboração nos assuntos relacionados à informática.

Aos meus pais Edison e Marlei pelo amor e carinho recebidos sempre.

A minha esposa Letícia pela dedicação e paciência nesses quatros anos e a quem tanto amo.

As minhas colegas Patrícia e Sandra pelo companheirismo e amizade que nunca serão esquecidos.

A Faculdade de Engenharia Química pelos equipamentos e a infra-estrutura disponibilizada para execução dos trabalhos experimentais.

A CAPES pela oportunidade a mim concedida de fazer parte do programa de pós-graduação e pelo apoio financeiro, sem o qual este projeto pessoal não poderia ser realizado.

Aos funcionários dos laboratórios que sempre se dispuseram a ajudar em necessidades.

Enfim, a todos que colaboraram para o bom desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS I
LISTA DE TABELAS IV
LISTA DE SÍMBOLOS VI
RESUMO VIII
ABSTRACT IX

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO 1
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4
2.1. ÓLEOS E GORDURAS 4
2.2. ÓLEO DE SOJA VEGETAL 5
2.3. INDÚSTRIA DE ÓLEOS VEGETAIS 6
2.4. LEVEDURA RESIDUAL DE CERVEJARIA 10
2.5. SURFACTANTES 11
2.6. EMULSIFICANTES 16
2.7. BIOSSURFACTANTES 16
2.8. CLASSIFICAÇÃO E NATUREZA QUÍMICA DOS BIOSSURFACTANTES 18
2.8.1. Glicolipídeos 19
2.8.2. Lipopeptídeos e lipoproteínas 25
2.8.3. Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos 27
2.8.4. Biossurfactantes poliméricos 28
2.8.5. Outros tipos de biossurfactantes 30
2.9. FUNÇÃO FISIOLÓGICA DOS BIOSSURFACTANTES 30
2.10. PROPRIEDADES DOS BIOSSURFACTANTES 31
2.11. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES E PARÂMETROS IMPORTANTES NA MESMA 32
2.12. RECUPERAÇÃO DE BIOTENSOATIVOS 48
2.13. APLICAÇÕES INDUSTRIAIS E TECNOLÓGICAS DOS BIOSSURFACTANTES 50
2.14. PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS E OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS 51
CAPÍTULO 3. MATERIAIS E MÉTODOS 53
3.1. MICRORGANISMOS 53
3.2. FONTES DE CARBONO 53
3.2.1. Óleos vegetais residuais 53
3.2.2. Levedura residual cervejeira 54
3.3. MEIOS DE CULTURA 54
3.3.1. Meio de cultura utilizado no isolamento dos microrganismos 54
3.3.2. Meio de cultura para a manutenção das cepas 55
3.3.3. Meio de cultura para o crescimento do microrganismo 55
3.3.4. Meio de cultura utilizado no processo fermentativo 56
3.4. SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES 57
3.4.1. Coleta das amostras de solo contaminado 57
3.4.2. Isolamento das estirpes microbianas 58
3.4.3. Manutenção das linhagens de Pseudomonas aeruginosa 59
3.4.4. Avaliação da produção de biossurfactantes pelos microrganismos isolados 59

3.4.5. Identificação da cultura microbiana *60*
3.5. EXPERIMENTOS 60
3.5.1. Preparação do inóculo e fermentação em incubadora rotativa *60*
3.5.2. Planejamentos experimentais fatoriais 2^4 ..... *60*
3.5.3. Planejamento experimental composto central *63*
3.5.4. Produção de biossurfactante em biorreator *67*
3.5.5. Regulação e processo fermentativo dos raminolipídeos *69*
3.5.6. Estudo comparativo da produção de biossurfactante a partir de óleos diferentemente processados *69*
3.6. RECUPERAÇÃO DE BIOTENSOATIVOS 69
3.7. CINÉTICA 70
3.7.1. Modelagem da produção fermentativa de raminose *70*
3.7.2. Construção do modelo cinético *71*
3.7.3. Modelagem do crescimento celular *72*
3.7.4. Modelagem das outras funções *72*
3.8. ANÁLISES QUANTITATIVAS 72
3.8.1. Morfologia *72*
3.8.2. Concentração de fósforo total *73*
3.8.3. Concentração de nitrogênio Kjeldahl total (NKT) *73*
3.8.4. Concentração de nitrato *73*
3.8.5. Tensão superficial *73*
3.8.6. Concentração de raminose *73*
3.8.7. Índice de emulsificação *74*
3.8.8. Biomassa *74*
3.8.9. Concentração de oxigênio dissolvido *75*
3.8.10. Procedimento de calibração do eletrodo *75*
3.8.11. Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La) em biorreator contendo o meio MPB. *75*
CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 77
4.1. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE PELOS MICRORGANISMOS ISOLADOS 77
4.2. PLANEJAMENTO FATORIAL A DOIS NÍVEIS PARA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 9027 E *P. AERUGINOSA* PALR 78
4.3. SEGUNDO PLANEJAMENTO FATORIAL A DOIS NÍVEIS UTILIZANDO OS MICRORGANISMOS *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 9027 E *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLADA PALC 85
4.4. RESULTADOS DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL (PCC) 92
4.4.1. Análise de regressão dos resultados obtidos na produção de raminose a partir das variáveis estudadas *94*
4.4.2. Análise de regressão dos resultados obtidos da tensão superficial a partir das variáveis estudadas *101*
4.4.3. Análise de regressão dos resultados obtidos para o índice de emulsão a partir das variáveis estudadas *106*
4.4.4. Análise de regressão dos resultados obtidos para o crescimento celular a partir das variáveis estudadas *113*
4.5. REPRODUTIBILIDADE DO PROCESSO FERMENTATIVO REALIZADO COM AS MELHORES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DEFINIDAS NO PCC 119
4.6. DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO (K_LA) 120

4.7. OTIMIZAÇÃO DA RELAÇÃO AERAÇÃO/AGITAÇÃO 122
4.8. RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO REALIZADO EM BIORREATOR 124
4.8.1. Análise de regressão dos resultados obtidos na produção de raminose a partir das variáveis estudadas 124
4.8.2. Análise de regressão dos resultados obtidos na tensão superficial a partir das variáveis estudadas 127
4.8.3. Análise de regressão dos resultados obtidos para o índice de emulsificação a partir das variáveis estudadas 130
4.8.4. Análise de regressão dos resultados obtidos para o crescimento celular a partir das variáveis estudadas 132
4.9. ESTUDO DA TAXA DE AERAÇÃO PARA VALORES MENORES DO QUE O MÍNIMO UTILIZADO NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL COMPLETO 134
4.10. REPRODUTIBILIDADE DA FERMENTAÇÃO NAS MELHORES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DEFINIDAS NO PCC E NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL COMPLETO 135
4.11. REGULAÇÃO E PROCESSO FERMENTATIVO DOS RAMINOLIPÍDEOS 136
4.12. ENSAIOS REALIZADOS PARA A PRODUÇÃO DE RAMINOSE UTILIZANDO COMO FONTE DE CARBONO ÓLEO DE SOJA IN NATURA (OSN), ÓLEO DE SOJA RESIDUAL PROVENIENTE DA FRITURA DE DIVERSOS ALIMENTOS (OSR) E ÓLEO DE SOJA DE FRITURAS EM SEPARADO DE CARNES (OSRC), SALGADOS (OSRS) E BATATINHA (OSRB) 139
4.13. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE RAMINOLIPÍDEOS 140
4.14. CINÉTICA E MODELAGEM DA PRODUÇÃO DE RAMINOSE, CRESCIMENTO CELULAR E CONSUMO DE NUTRIENTES 142
4.15. VALIDAÇÃO DO MODELO CINÉTICO REALIZADO EM REATOR DE 3 LITROS 145
CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES 147
CAPÍTULO 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 149
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 150

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Estrutura geral de um triacilglicerol - R1, R2, R3 = grupo alquil saturado ou insaturado, podendo ser igual ou diferente – (MORETTO & FETT, 1998). 4

Figura 2.2. Oleaginosas predominantes para cada região do país (http://www.biodieselbrasil.com.br). 6

Figura 2.3. Complexo soja no Brasil em 2007 (http://www.abiove.com.br). 6

Figura 2.4. Fluxograma da obtenção do óleo refinado (BATISTA *et al*., 1999). 8

Figura 2.5. Ilustração das forças atrativas intermoleculares de moléculas na superfície e no seio do líquido (BRADY & HUMISTON, 1981). 13

Figura 2.6. Representação do efeito da concentração de um surfactante na adsorção em superfícies (PORTER, 1994). 14

Figura 2.7. Biossíntese de raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* (OSHNER *et al.*, 1996). 21

Figura 2.8. Estrutura química da molécula de raminolipídeos (ABALOS *et al*, 2001). 21

Figura 2.9. Estrutura de trealoselipídeo produzido por *Rhodococcus erythropolis* (DESAI & BANAT, 1997). 24

Figura 2.10. Estrutura do soforoselipídeo produzido por *Torulopsis bombicola* (DESAI & BANAT, 1997). 24

Figura 2.11. Estrutura da surfactina produzida por *Bacillus subtilis* (DESAI & BANAT, 1997). 26

Figura 2.12. Estrutura genérica de um fosfolipídeo (COOPER & ZAJIC, 1980). 27

Figura 2.13. Estrutura do Emulsan produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* RAG1 (DESAI & BANAT, 1997). 29

Figura 3.1. Foto das duas lagoas localizadas na Fazenda Rio das Pedras, mostrando a divisa do terminal de combustível com a propriedade. 57

Figura 3.2. Foto da lagoa mostrando a caneleta e o bocal de descarga do efluente na mesma. 58

Figura 4.1. Diagrama de Pareto, mostrando a contribuição das variáveis estudadas para a produção de raminose. 80

Figura 4.2. Diagrama de Pareto mostrando a contribuição das variáveis estudadas na redução da tensão superficial. 81

Figura 4.3. Diagrama de Pareto mostrando a contribuição das variáveis estudadas para o índice de emulsificação. 82

Figura 4.4. Diagrama de Pareto mostrando a contribuição das variáveis estudadas para o crescimento celular. 83

Figura 4.5. Diagrama de Pareto mostrando a contribuição das variáveis estudadas para a produção de raminose. 86

Figura 4.6. Diagrama de Pareto mostrando a contribuição das variáveis estudadas na redução da tensão superficial. 87

Figura 4.7. Diagrama de Pareto mostrando a contribuição das variáveis estudadas para o índice de emulsificação. 88

Figura 4.8. Diagrama de Pareto mostrando a contribuição das variáveis estudadas para o crescimento celular. 89

Figura 4.9. Distribuição dos resíduos relativos à síntese de raminose. 96
Figura 4.10. Valores preditos em função dos observados relativos à síntese de raminose. 97
Figura 4.11. Superfície de resposta para a síntese de raminose em função da concentração de óleo de soja residual e nitrato de amônio..... 98
Figura 4.12. Curvas de contorno para a resposta raminose em função da concentração de óleo de soja residual e nitrato de amônio. 98
Figura 4.13. Superfície de resposta para a síntese de raminose em função da concentração de óleo de soja residual e levedura cervejeira residual..... 99
Figura 4.14. Curva de contorno para a reposta raminose em função da concentração de óleo de soja residual e resíduo de cerveja..... 99
Figura 4.15. Superfície de resposta para a síntese de raminose em função da concentração de nitrato de amônio e levedura cervejeira residual. 100
Figura 4.16. Curva de contorno para a resposta raminose em função da concentração de nitrato de amônio e levedura cervejeira residual. 100
Figura 4.17. Distribuição dos resíduos relativos à tensão superficial. 102
Figura 4.18. Valores preditos em função dos observados relativos à tensão superficial. 102
Figura 4.19. Superfície de resposta para a tensão superficial em função da concentração de óleo de soja residual e nitrato de amônio..... 103
Figura 4.20. Curva de contorno para a resposta tensão superficial em função da concentração de óleo de soja residual e nitrato de amônio..... 104
Figura 4.21. Superfície de resposta para a tensão superficial em função da concentração de óleo de soja residual e resíduo de levedura cervejeira..... 104
Figura 4.22. Curva de contorno para a resposta tensão superficial em função da concentração de óleo de soja residual e resíduo de cerveja..... 105
Figura 4.23. Superfície de resposta para a tensão superficial em função da concentração de nitrato de amônio e resíduo de levedura cervejeira. 105
Figura 4.24. Curva de contorno para a resposta tensão superficial em função da concentração de nitrato de amônio e resíduo de cerveja. 106
Figura 4.25. Distribuição dos resíduos relativos ao índice de emulsão..... 108
Figura 4.26. Valores preditos em função dos observados relativos ao índice de emulsão. 108
Figura 4.27. Superfície de resposta para o índice de emulsão em função da concentração de óleo de soja residual e nitrato de amônio..... 109
Figura 4.28. Curva de contorno para a resposta índice de emulsão em função da concentração de óleo de soja residual e nitrato de amônio..... 110
Figura 4.29. Superfície de resposta para o índice de emulsão em função da concentração de óleo de soja residual e resíduo de cerveja..... 110
Figura 4.31. Superfície de resposta para o índice de emulsão em função da concentração de nitrato de amônio e resíduo de cerveja. 112
Figura 4.32. Curva de contorno para a resposta índice de emulsão em função da concentração de nitrato de amônio e resíduo de cerveja. 112
Figura 4.33. Distribuição dos resíduos relativos ao crescimento celular. 114

Figura 4.34. Valores preditos em função dos observados relativos ao crescimento celular. 114

Figura 4.35. Superfície de resposta para a biomassa em função da concentração de óleo de soja residual e nitrato de amônio. 116

Figura 4.36. Curvas de contorno para a resposta biomassa em função da concentração de óleo de soja residual e nitrato de amônio. 116

Figura 4.37. Superfície de resposta para a biomassa em função da concentração de óleo de soja residual e resíduo de cerveja. 117

Figura 4.38. Curvas de contorno para a resposta biomassa em função da concentração de óleo de soja residual e resíduo de cereja. 117

Figura 4.39. Superfície de resposta para a biomassa em função da concentração de nitrato de amônio e resíduo de cerveja. 118

Figura 4.40. Curvas de contorno para a resposta biomassa em função da concentração de nitrato de amônio e resíduo de cerveja. 118

Figura 4.41. Transferência de oxigênio em função da taxa de aeração com velocidade de agitação de 550 rpm e taxas de aeração de 0,5, 1,0 e 1,5 vvm. 121

Figura 4.42. Superfície de resposta da concentração de raminose em função da agitação e aeração para a produção de raminose. 126

Figura 4.43. Curvas de contorno em função da agitação e aeração para a produção de raminose. 126

Figura 4.44. Superfície de resposta da tensão superficial em função da agitação e aeração para a tensão superficial. 129

Figura 4.45. Curvas de contorno em função da agitação e aeração para tensão superficial. 129

Figura 4.46. Superfície de resposta do índice de emulsificação em função da agitação e aeração para o índice de emulsão. 131

Figura 4.47. Curvas de contorno em função da agitação e aeração para o índice de emulsão. 131

Figura 4.48. Superfície de resposta da concentração de biomassa em função da agitação e aeração para a biomassa. 133

Figura 4.49. Curvas de contorno em função da agitação e aeração para a biomassa. .. 134

Figura 4.50. Evolução ao longo do tempo das concentrações de biomassa (□), nitrato (◇), Fósforo total (▲), Nitrogênio Kjeldahl total (∇), e Raminose (•) durante o cultivo da *Pseudomonas aeruginosa* PALC em biorreator usando uma taxa de aeração 0,5 vvm e velocidade de agitação de 555 rpm. Os símbolos representam os resultados experimentais e as linhas, os dados resultantes do modelo cinético descrito pelas equações de (3.11) a (3.15). 143

Figura 4.51 - Evolução ao longo do tempo das concentrações de biomassa (□), nitrato (◇), Fósforo total (▲), Nitrogênio Kjeldahl total (∇), e Raminose (•) durante o cultivo da *Pseudomonas aeruginosa* PALC em biorreator (3 litros) usando um a taxa de aeração 0,5 vvm e velocidade de agitação de 555 rpm. Os símbolos representam os resultados experimentais e as linhas, os dados resultantes do modelo cinético descrito pelas equações de (3.11) a (3.15). 145

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Porcentagem de ácidos graxos nos diferentes óleos vegetais (VIEIRA *et al.*, 2005). 5

Tabela 2.2. Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética (NITSCHKE & PASTORE, 2002). 19

Tabela 3.1. Composição básica do resíduo seco (100% *Saccharomyces cerevisiae*) 54

Tabela 3.2. Composição dos meios de cultura utilizados para o isolamento de microrganismos 55

Tabela 3.3. Composição do meio de cultura utilizado para o crescimento dos microrganismos produtores de biossurfactantes 56

Tabela 3.4. Composição do meio de cultura utilizado para a produção de biossurfactantes 56

Tabela 3.5. Matriz do planejamento experimental a dois níveis 63

Tabela 3.6. Matriz de planejamento experimental (PCC) com três variáveis 64

Tabela 3.7. Concentrações empregadas para cada variável nos 16 experimentos do PCC 65

Tabela 3.8. Matriz do planejamento fatorial completo a três níveis 68

Tabela 4.1. Valores da tensão superficial após cultivo dos microrganismos isolados em meio mineral (M1) acrescido de 1% de óleo de soja residual, e respectivas percentagens de redução da tensão superficial do meio 77

Tabela 4.2. Resultados médios de produção de raminose, índice de emulsificação, tensão superficial e crescimento celular obtidos durante a realização dos Experimentos com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *P. aeruginosa* PALR 79

Tabela 4.3. Resultados médios de produção de raminose, índice de emulsificação, tensão superficial e crescimento celular obtidos durante a realização dos Experimentos 85

Tabela 4.4. Resultados médios de produção de raminose, índice de emulsificação, tensão superficial e crescimento celular obtidos durante a realização dos experimentos empregando a cultura isolada PALC 93

Tabela 4.5. Resultados da regressão para a produção de raminose 95

Tabela 4.6. Resultados da regressão para a tensão superficial 101

Tabela 4.7. Resultados da regressão para o índice de emulsão 107

Tabela 4.8. Resultados da regressão para o crescimento celular 113

Tabela 4.9. Comparativo dos resultados obtidos no ponto central do planejamento (PCC) com os valores reais resultantes das concentrações das variáveis independentes OSR, NA e LCR 119

Tabela 4.10. Comparativo dos resultados de produção de raminose, tensão superficial, índice de emulsificação e crescimento celular obtidos no PCC (ensaios 15 (C) e 16 (C)), com a sua respectiva reprodutibilidade (repetição) 120

Tabela 4.11. Variação dos valores de K_La em função da taxa de aeração e velocidade de agitação em meio MPB 121

Tabela 4.12. Resultados médios da síntese raminose, índice de emulsificação, tensão superficial e crescimento celular a partir da variação do KLa após 48 horas de fermentação 122

Tabela 4.13. Resultados da regressão para a produção de raminose 125

Tabela 4.14. Resultados da regressão para a tensão superficial 127

Tabela 4.15. Resultados da regressão para o índice de emulsificação 130

Tabela 4.16. Resultados da regressão para o crescimento celular 132

Tabela 4.17. Variação da síntese de raminose, tensão superficial, índice de emulsificação e biomassa em função da aeração 135

Tabela 4.18. Resultados médios de produção de raminose, índice de emulsificação, tensão superficial e crescimento celular obtidos durante a realização do experimento utilizando as melhores condições obtidas nos dois últimos planejamentos experimentais 136

Tabela 4.19. Resultados médios de produção de raminose, índice de emulsificação, tensão superficial e biomassa obtida durante a realização do experimento utilizando as melhores condições obtidas nos dois últimos planejamentos experimentais, sem a presença do óleo de soja residual 137

Tabela 4.20. Resultados médios de produção de raminose, índice de emulsificação, tensão superficial e biomassa obtida durante a realização do experimento utilizando as melhores condições obtidas nos dois últimos planejamentos experimentais, sem a presença dos sais inorgânicos 138

Tabela 4.21. Resultados obtidos para a síntese de raminose, tensão superficial e índice de emulsão utilizando como fonte de carbono OSN, OSR, e oriundos de frituras em separado OSRC, OSRS e OSRB. 139

Tabela 4.22. Resultados de produção de raminolipídeos, índice de emulsificação e tensão superficial obtidos a partir da extração orgânica e coluna de adsorção do meio fermentado após 48 horas de processo 141

Tabela 4.23. Valores dos parâmetros obtidos pelo ajuste paramétrico 144

Tabela 4.24. Comparação dos rendimentos experimental (Yexp), e rendimento dado pelo Modelo (Ymod) para a conversão de nitrogênio Kjeldahl total, fósforo total, e nitrato em biomassa (X) 144

LISTA DE SÍMBOLOS

β_0	valor médio da resposta;
a,b, c,....p	constantes ou parâmetro da equação;
C	concentração de oxigênio dissolvido no instante t (mmol/L)
C*	concentração de oxigênio dissolvido na saturação (mmol/L).
C_C	crescimento celular
IE	índice de emulsificação, %
K_La	coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio
LCR	levedura cervejeira residual
MPB	meio de produção de biossurfactante
NA	concentração de nitrato de amônio, g/L
OSN	óleo de soja *in natura*
OSR	óleo de soja residual
OSRB	óleo de soja residual usado somente na fritura batatas
OSRC	óleo de soja residual usado somente na fritura de carnes
OSRS	óleo de soja residual usado somente na fritura de salgados
PALC	*Pseudomonas aeruginosa* isolada de lagoa contaminada)
PARL	*Pseudomonas aeruginosa* isolada de *Landfarming* Reduc
PCC	planejamento composto central
ε	resíduo de estimação
RM	produção de raminose, g/L
RPM	rotação por minuto
TS	tensão superficial, dina/cm

μ	velocidade específica de crescimento, 1/h
VVM	volume de ar por volume de mosto
X_0	concentração inicial de células, g/L
X_f	concentração final de células, g/L
Y_{exp}	resultado experimental
Y_t	resultado teórico
γ	consumo de nitrogênio, g Nt/g biomassa/h
α	consumo de nitrato, g NO_3^-/g biomassa/h
β	consumo de fósforo, g Pt/g biomassa/h
λ	rendimento de raminolipídeos, g Ram/g biomassa/h

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo investigar a produção de biossurfactante empregando culturas de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando como fonte de carbono óleos de soja residual proveniente da fritura de diversos alimentos. Nos primeiros ensaios foram empregados a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* isolada do Landfarming REDUC (PALR) e a *Pseudomonas aeruginosa* PALC, isolada de solo de uma lagoa contaminada com hidrocarbonetos. Para selecionar a *Pseudomonas* e avaliar os resultados dos ensaios foi utilizado um planejamento fatorial a dois níveis, estudando como variáveis a linhagem de microrganismo, as concentrações de óleo de soja residual (OSR), de nitrato de amônio (NA) e de levedura cervejeira residual (LCR). Os experimentos foram realizados em Erlenmeyers de 500 mL de capacidade contendo 50 mL do meio de produção, a 170 rpm e temperatura de 30 ± 1ºC durante 48 h de fermentação. A produção de biossurfactante foi monitorada pelas determinações da tensão superficial (TS), da concentração de raminose (RM) produzida e da atividade emulsificante (IE). As *P. aeruginosa* PALR, ATCC 9027 e a PALC foram capazes de reduzir a tensão superficial do meio de 62 dina/cm ± 1 para 33,9; 28 e 26 dina/cm, produzir em g/L 0,25; 0,77 e 1,39 de raminose, com índice de emulsão de 60, 100 e 100%, respectivamente. Os resultados obtidos nestes planejamentos experimentais demonstraram que a *Pseudomonas aeruginosa* isolada PALC apresentou maior potencial para produzir biossurfactante, sendo, portanto, selecionada para os demais experimentos realizados neste estudo. A otimização das concentrações do OSR, NA e da LCR foram obtidas a partir de um planejamento de experimento composto central (PCC) e seus resultados analisados pelas superfícies de resposta. Os melhores resultados do planejamento foram encontrados no ponto central, correspondendo a 22 g/L de OSR, 5,625 g/L de NA e 11,5 g/L de LCR. A maior concentração obtida de raminose após 48 horas de fermentação, foi 2,3 g/L com índice de emulsão de 100%. A partir do melhor resultado obtido no PCC, determinou-se, utilizando um bioreator, as melhores condições de taxa de aeração (vvm) e velocidade de agitação (rpm) empregando um planejamento fatorial completo. Nas condições otimizadas, de 0,5 vvm (K_La de 10,2 h^{-1}) e velocidade de agitação de 550 rpm, foram obtidos a tensão superficial de 26,0 dina/cm e síntese de raminose de 3,26 g/L. A partir das condições otimizadas, a produção de biossurfactante proveniente da mistura de óleo de soja residual foi comparada com óleo de soja *in natura* (OSN) e óleo de soja residual usado na fritura em separado de carnes (OSRC), salgados (OSRS) e batatas (OSRB). Finalmente foi feito um estudo cinético, visando determinar um modelo que representasse os dados experimentais de produção de raminose e de consumo de nutrientes. Após recuperação e purificação do biossurfactante a concentração de raminose aumentou em 80% no produto final, ou seja, 6,8 g/L.

PALAVRAS-CHAVE: biossurfactantes, glicolipídeos, *Pseudomonas aeruginosa*, raminolipídeos.

ABSTRACT

This work has as objective to investigate the production of biosurfactant employing strain of *Pseudomonas aeruginosa* using as source of carbon residual soybean oil from several foods frying. In the first assay the *Pseudomonas aeruginosa* were used ATCC 9027, isolated *Pseudomonas aeruginosa* from Landfarming REDUC (PALR) and a *Pseudomonas aeruginosa* PACL strain, isolated from a lagoon hydrocarbon-contaminated soil. To evaluate the results of the assay a two levels complete factorial experimental design was used, studying as variables the microorganism strain, the concentrations of residual soybean oil (OSR), the concentrations of nitrate of ammonium (AN) and brewery residual yeast (YRB). The experiments were performed in 500-mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of production medium, at 170 rpm and 30±1ºC, for a 48-hour fermentation period. Biosurfactant production has been monitored by measurements of rhamnose concentration (RM), surface tension (TS) and emulsifying activity (IE). The *P. aeruginosa* PALR, ATCC 9027 and the PALC were capable to reduce the superficial tension of the initial medium of 61± 1dynes/cm for 33,9; 28 e 26 dynes/cm, to produce g/L 0,25; 0,77 e 1,39 of rhamnose, with emulsification index of 60, 100 and 100%, respectively. The results obtained by experimental design proved that isolated *Pseudomonas aeruginosa* PALC presented potential greater to produce biossurfactante, being, therefore, selected for the other experiments carried out in at study. The optimization of OSR, AN, and RBY was accomplished by a central composite design (CCD) and their results analyzed by surface response analysis. The best planned results, was located on the central point, have corresponded to 22 g/L of RSO, 5.625 g/L of AN, and 11.5 g/L of RBY. The greater obtained concentration of rhamnose after 48 hours of fermentation, was 2,3 g/L with emulsifying activity of 100%. Employed the best result obtained in PCC, was determined, using a bioreactor, the best conditions of aeration rate (vvm) and agitation speed (rpm) using a complete factorial experimental design. In the optimized conditions, of 0,5 vvm (KLa of 10,2 h^{-1}) and speed of agitation of 550 rpm, were obtained the superficial tension of 26,0 dyne/cm and synthesis of rhamnose of 3,26 g/L. Under the optimized conditions, the biosurfactant production from a mixture of waste frying soybean oil was compared with non used soybean oil (NUSO) and waste soybean oils used to fry in separate meats (MFSO), salty (SAFSO), and potatoes (POFSO). Finally was made a kinetic study, seeking to determine a model to represent the experimental data of rhamnose production and the nutrients consumption. After recovery and purification of the biosurfactant the rhamnose concentration increased in 80% in the final product, that is, 6,8 g/L.

KEYWORDS: biosurfactants, glycolipids, P*seudomonas aeruginosa*, rhamnolipids.

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes são moléculas que apresentam grupos hidrofílicos e hidrofóbicos e agem em interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água). A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, reduz as tensões interfacial e superficial. Estas propriedades tornam os surfactantes adequados para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, molhabilidade, solubilização e dispersão de fases (URUM & PEKDEMIR, 2004).

Os biossurfactantes são substâncias de origem microbiana que apresentam alta atividade superficial e interfacial. São produzidos por biotransformação de matérias-primas renováveis, apresentando baixos impactos ambientais e vantagem seria melhor em relação aos detergentes químicos convencionais (BANAT *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2000). Entre as vantagens e características, os biossurfactantes apresentam termoestabilidade, tolerância à força iônica, biodegradabilidade e baixa toxicidade (MULLIGAN *et al*, 1989).

Nos países industrializados há uma tendência para a substituição dos surfactantes sintéticos pelos naturais. Esta tendência é movida pela necessidade de aplicação de bioprodutos, substituindo compostos não biodegradáveis (alquil benzenos ramificados) (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes podem ser aplicados em áreas como agricultura, para a formulação de pesticidas e herbicidas; na indústria alimentícia, bem como aditivos em condimentos; nas indústrias farmacêuticas, têxtil, cosmética; e petrolífera, onde são amplamente utilizados para a recuperação secundária do petróleo, como na remoção de resíduos de óleo e biorremediação (RON & ROSENBERG, 2002).

Alguns biossurfactantes têm propriedades antimicrobianas, resultando na destruição de microrganismos pela lise de suas membranas celulares. No microambiente esta propriedade é importante para evitar competição com outros microrganismos pelo alimento (SANDRIN *et al.*, 1990; THIMON *et al.*, 1991).

Ao considerar as potencialidades de aplicação dos biossurfactantes, deve-se lembrar que estas macromoléculas são produzidas por uma grande variedade de microrganismos e que possuem diferentes estruturas químicas e propriedades de superfície. O tipo e a quantidade de biossurfactante produzido dependem primeiramente do tipo de microrganismo produtor e de fatores como fontes de carbono e nitrogênio

concentração de nutrientes, elementos traços, agitação, aeração e outros fatores que podem influenciar na produção destes compostos por microrganismos (FRANCY *et al.*, 1991).

Os glicolipídeos são os surfactantes microbianos mais conhecidos e, dentre estes, os raminolipídeos estão entre os mais bem estudados. Biossurfactantes raminolipídicos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* são formados por uma ou duas raminoses ligadas a uma ou duas moléculas de ácido graxo, com a cadeia alquila, saturada ou insaturada, entre C_8 e C_{12} (RENDELL *et al.*¸1980). Dependendo da combinação entre as moléculas de raminose e o tipo de cadeia hidrocarbonada, é possível a obtenção de diferentes homólogos (LANG & WAGNER, 1998).

A dificuldade em encontrar o balanço correto dos componentes empregados no processo fermentativo, a otimização das condições operacionais desse processo, assim como os aditivos necessários à otimização, quer do crescimento microbiano, quer da produção de tensoativos, tem estimulado a pesquisa da produção de biossurfactante.

A economia é outro grande desafio nos processos biotecnológicos, especialmente para a produção de biossurfactantes. O sucesso para a produção de biossurfactante depende do desenvolvimento de processos mais baratos e a utilização de matéria prima de baixo custo, as quais, não devem ultrapassar 10 a 30% os custos do produto final (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998).

A maior parte dos relatos encontrados na literatura sobre a utilização de produtos ou subprodutos agroindustriais, está relacionada a produtos puros como carboidratos e óleos vegetais. No entanto, pouco tem sido publicado sobre a utilização dos resíduos hidrofóbicos como substratos gerados de frituras de alimentos provenientes de óleos vegetais (BENICASA, 2002).

A soja é atualmente a mais importante oleaginosa produzida no Brasil cuja produção em 2006/07 foi estimada em 55 milhões de toneladas (http://www.abiove.com.br).

No comércio exterior o complexo soja: produção de grãos, de farelo e refino de óleo vegetal movimenta mais de 5 bilhões de dólares (www.eq.ufrj.br/posgraduacao/aulas/suely/2006/aula2_oleaginosas.ppt).

Um levantamento primário da oferta de óleos residuais de frituras, suscetíveis de serem coletados (produção > 100 kg ao mês), revela um valor da oferta brasileira superior a 30.000 toneladas anuais (PARENTE, 2003).

Assim, a proposta desse trabalho foi estudar a produção por fermentação de biossurfactante empregando como substrato óleo de soja utilizado na fritura de diversos alimentos, em meio com a mínima quantidade de sais minerais e como fator de crescimento levedura cervejeira industrial autolizada. Neste estudo foram utilizadas duas culturas isoladas e identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* e uma de linhagem conhecida (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027).

Como objetivos específicos para o desenvolvimento do trabalho pode-se citar:

- Isolar e selecionar, linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* para a produção de biossurfactante;
- Otimizar as condições operacionais do processo fermentativo empregando como variáveis independentes a concentração de óleo de soja residual, de nitrato de amônio e de levedura cervejeira residual, em frascos agitados;
- Otimizar as melhores condições operacionais em relação ao nível de agitação e aeração em biorreator;
- Comparar a produção de raminolipídeos utilizando como fonte de carbono óleos de soja residuais, provenientes da fritura de distintos alimentos, e *in natura*;
- Realizar a extração e a purificação dos raminolipídeos obtidos;
- Construir um modelo para descrever o comportamento cinético da produção de raminose, os consumos de fósforo, nitrato e nitrogênio totais, em função do crescimento celular.

CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Óleos e gorduras

Os óleos e gorduras são substâncias insolúveis em água (hidrofóbicas), de origem animal ou vegetal, formado predominantemente por ésteres de triacilgliceróis, produtos resultantes da esterificação entre o glicerol e ácidos graxos. Os triacilgliceróis (Figura 2.1) são compostos insolúveis em água e a temperatura ambiente, possuem uma consistência de líquido para sólido (MORETTO & FETT, 1998).

Segundo a resolução nº 20/77 do CNNPA (Conselho Nacional de Normas e Padrões para Alimentos) a diferença entre óleos e gorduras, é o estado físico em que se encontram abaixo da temperatura de 20ºC (http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public).

Quando o estado é sólido em uma temperatura de até 20ºC é classificado como gordura. As gorduras encontram-se no estado sólido pela constituição química dos ácidos graxos formadores dos triglicerídeos que são saturados, isto é, não apresentam duplas ligações, resultando em estruturas lineares aumentando a superfície de contato entre as moléculas favorecendo uma maior interação intermolecular, denominada força de "Van der Waals", aumentando o ponto de fusão que é a temperatura da passagem do estado sólido para o líquido (MITTELBACH, 1992)

Além de triacilgliceróis, os óleos contêm vários componentes em menor proporção, como mono e diglicerídeos (importantes como emulsionantes); ácidos graxos livres; tocoferol (importante antioxidante); proteínas, esteróis e vitaminas (FARIA *et al*., 2002; HIDALGO *et al*., 2001).

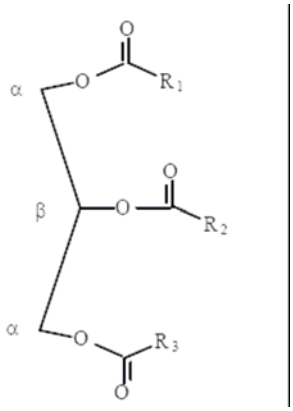


Figura 2.1. Estrutura geral de um triacilglicerol - R1, R2, R3 = grupo alquil saturado ou insaturado, podendo ser igual ou diferente – (MORETTO & FETT, 1998).

2.2. Óleo de soja vegetal

A maior parte do óleo de soja é composto por gordura insaturada. Ácidos graxos poliinsaturados (ácido linolênico e linoléico), monoinsaturados (ácido olêico) e saturados (ácido palmítico e esteárico) correspondem, em média, a 61%, 25% e 15%, respectivamente. O ácido linolênico (componente da fração poliinsaturada do óleo), que corresponde, em média, a 7% da composição do óleo, é um ácido graxo ômega-3. A soja é uma das poucas fontes vegetais de ácidos graxos ômega-3. Ácidos graxos ômega-3 são nutrientes essenciais para crianças e podem ajudar a reduzir os riscos tanto de doenças do coração quanto de câncer (GREAVES *et al*., 2000).

Ácidos graxos são ácidos carboxílicos alifáticos de cadeias longas, encontrados em gorduras e óleos naturais. Estes ácidos podem ou não apresentar ligações duplas entre as moléculas de carbono, sendo classificados como saturados (sem ligação dupla) com 4 a 24 unidades de carbono na cadeia ou insaturados (ligações duplas) com 10 a 30 carbonos e com 1 a 6 ligações duplas na cadeia. Por sua vez, os ácidos graxos saturados podem ser monoinsaturados (apenas uma ligação dupla) ou poliinsaturados (mais de uma ligação dupla). Também existem ácidos com cadeias ramificadas, cíclicas, cetônicas, hidroxiladas e epoxiladas. (MOTHÉ & CORREIA, 2005).

A Tabela 2.1 apresenta a diferença nas propriedades dos diversos óleos vegetais referentes à composição em ácidos graxos.

Tabela 2.1. Porcentagem de ácidos graxos nos diferentes óleos vegetais (VIEIRA *et al.*, 2005).

Ácido Graxo	Soja	Algodão	Milho	Oliva
Mirístico	0,1	1,0	0	0,1
Palmítico	10,5	25,0	11,5	16,9
Esteárico	3,2	2,8	2,2	3,9
Oléico	22,3	17,1	26,6	63
Linoléico	54,5	52,7	58,7	14,8
Linolênico	8,3	0	0,8	0,9
Eicosanóico	0,2	0	0,2	0
Eicosenóico	0,9	0	0	0,4

A grande dimensão territorial brasileira possibilita o cultivo de uma enorme variedade de oleaginosas (soja, algodão, mamona, girassol e outras). Cada variedade adapta-se em diferentes regiões do país, conforme mostra a Figura 2.2.

Figura 2.2. Oleaginosas predominantes para cada região do país (http://www.biodieselbrasil.com.br).

2.3. Indústria de óleos vegetais

A soja é atualmente a mais importante oleaginosa produzida no Brasil cuja produção para a safra 2006/07 (fevereiro a janeiro) estima-se entorno de 55,2 milhões de toneladas de grãos. A Figura 2.3 apresenta a distribuição do complexo soja no Brasil (http://www.abiove.com.br).

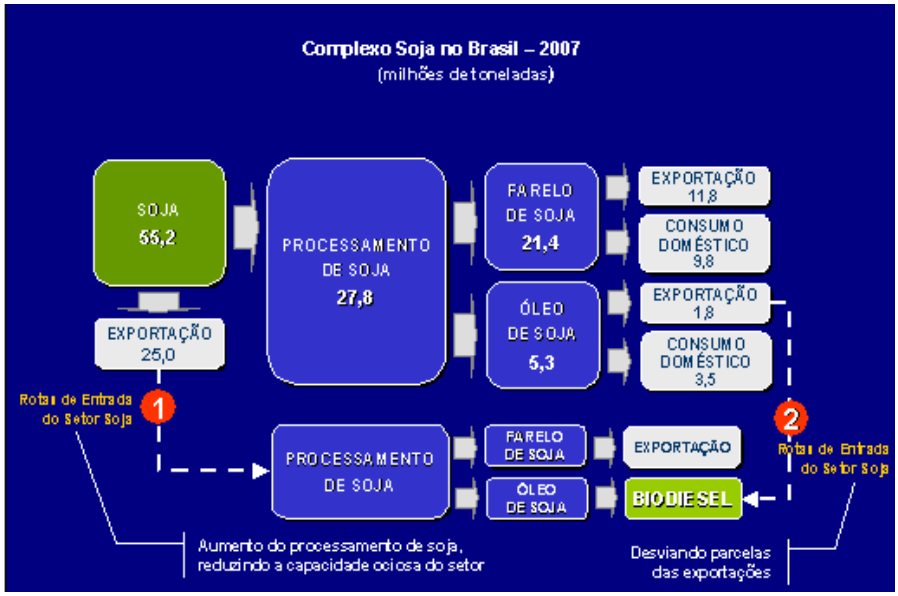


Figura 2.3. Complexo soja no Brasil em 2007 (http://www.abiove.com.br).

A obtenção do óleo vegetal bruto é feita por meio de métodos físicos e químicos a partir das sementes de oleaginosas usando-se um solvente como extrator e prensagem (GONÇALVES *et al*., 2002; MORETTO & FETT, 1998; MORETTO *et al*., 2002).

Nesta fase, o óleo vegetal contém impurezas como ácidos graxos livres, pigmentos, tocoferóis, fosfatídeos, graxas, proteínas, açúcares, gomas, pesticidas, micotoxinas, metais e outros, e necessitam de processos de refino para remover essas impurezas, prejudiciais à qualidade e estabilidade do produto, pelos processos de refino que envolve a remoção do solvente, a degomagem, o branqueamento, a desacidificação e a desodorização (BATISTA *et al*., 1999).

Porém, a retirada total dessas impurezas é crítica e causa efeitos indesejáveis, como menor ponto de fumaça do óleo pela presença de ácidos graxos livres, efeito pro-oxidante do metal e precipitação e escurecimento do óleo pelos fosfatídeos. Além dos problemas relacionados com os processos de refino do óleo, dietas ricas em gorduras com altos níveis de ácidos graxos saturados, contribuem para o aumento de doenças cardiovasculares devido à elevação dos níveis de colesterol no sangue (HARTMAN *et al*, 1996).

Dos resíduos da extração, torta, no caso da prensagem, farelo, no caso de extração por solvente, menos de 20 % são usados para alimentação humana. Geralmente são usados para a preparação de rações para animais.

A Figura 2.4 representa o fluxograma do processo de refinação de óleos vegetais

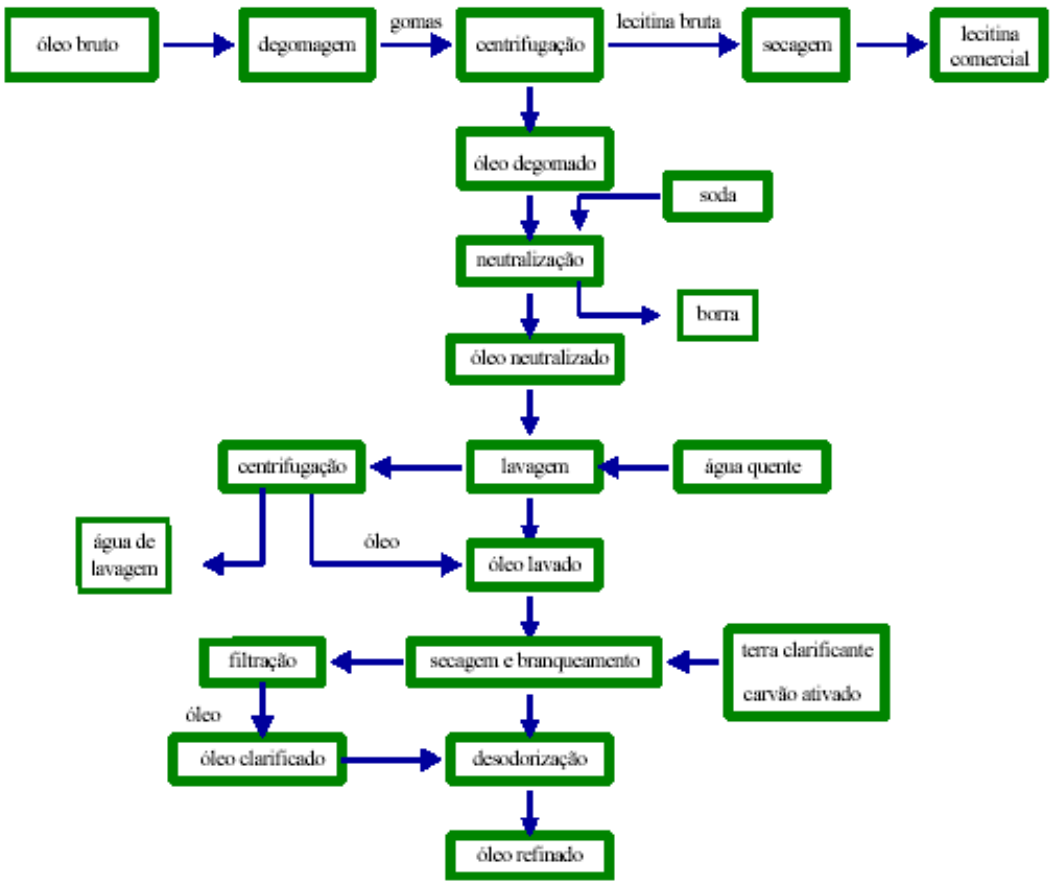


Figura 2.4. Fluxograma da obtenção do óleo refinado (BATISTA *et al*., 1999).

A maior parte dos óleos e gorduras produzidos no mundo são usados na indústria de alimentos, gerando grandes quantidades de resíduos. Os chamados óleos vegetais são geralmente óleos de soja, sendo o de cozinha mais conhecido (LANG & WULLBRANDT, 1999).

Hoje no Brasil, parte do óleo vegetal residual do consumo humano é destinada à fabricação de sabões ou de rações para animais, entretanto, a maior parte é descartado na rede de esgotos, um crime ambiental inadmissível. A pequena solubilidade dos óleos vegetais na água constitui um fator negativo no que se refere à sua degradação em unidades de tratamento de despejos por processos biológicos e, quando presentes em mananciais utilizados para abastecimento público, causam problemas no tratamento da água (MITTELBACH & TRITTHART, 1988).

A presença deste material, além de acarretar problemas de origem estética, diminui a área de contato entre a superfície da água e o ar atmosférico impedindo a transferência do oxigênio da atmosfera para a água, e também os óleos e graxas em seu processo de decomposição, reduzem o oxigênio dissolvido elevando a DBO (Demanda

Bioquímica de Oxigênio), causando alteração no ecossistema aquático (www.biodieselbrasil.com.br).

Segundo Mittelbach (1992), as possíveis fontes dos óleos e gorduras residuais podem ser encontrados em diferentes locais como:

1. As lanchonetes e nas cozinhas industriais, comerciais e domésticas, onde são praticadas as frituras de alimentos;
2. Nas indústrias as quais processam frituras de produtos alimentícios, como amêndoas, tubérculos, salgadinhos, e várias outras modalidades de petiscos;
3. Nos esgotos municipais onde a nata sobrenadante é rica em matéria graxa, possível de se extraírem óleos e gorduras;
4. Em águas residuais de processos de certas indústrias alimentícias, como as indústrias de pescados, de couro, etc.

Na Alemanha, por exemplo, eram coletados em torno de 3,8 a 5,0 x 10^5 toneladas de óleos e gorduras por ano (ANGGRAINI, 1999). Na Áustria, consumia-se anualmente uma média de 120.000 toneladas de óleos e gorduras, sendo cerca de 50% utilizados na fritura de alimentos. Estima-se que um total de 3,7 x 10^4 toneladas foram coletadas (MITTELBACH, 1992; MITTELBACH, 2000).

A reutilização de óleos vegetais residuais de processos de frituras de alimentos tem se mostrado atraente para a produção de biossurfactante, pois, o reaproveitamento do óleo vegetal como fonte de carbono para as transformações microbianas após a sua utilização na cadeia alimentar resulta numa destinação alternativa a um resíduo da produção de alimentos (MIELKE, 1992).

De acordo com Kosaric *et al* (1984), muitos substratos alternativos têm sido sugeridos para a produção de biossurfactantes, especialmente resíduos de águas miscíveis: melados, soro de leite ou resíduos destilados.

A maior parte dos relatos encontrados na literatura sobre a utilização de produtos ou subprodutos agroindustriais, está relacionada a produtos puros como carboidratos e óleos vegetais. No entanto, pouco tem sido publicado sobre a utilização dos resíduos hidrofóbicos como substratos gerados de frituras de alimentos provenientes de óleos vegetais (BENICASA, 2002).

A economia é freqüentemente o grande desafio nos processos biotecnológicos, especialmente para a produção de biossurfactantes. O sucesso para a produção de biossurfactante depende do desenvolvimento de processos mais baratos e a utilização de

matéria prima de baixo custo, as quais, não devem ultrapassar 10 a 30% os custos do produto final (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998).

2.4. Levedura residual de cervejaria

A biomassa de levedura (*Saccharomyces* sp.) tem sido produzida no Brasil no setor sucro-alcooleiro, com uma produção anual de cerca de 240 mil ton/ano, como subproduto da produção de etanol (FURCO, 1996); no setor de panificação, com uma produção brasileira de cerca de 120 mil ton/ano e no setor cervejeiro, contribuindo com cerca de 3500 ton/ano (PEIXOTO, 1996).

Nas cervejarias, ao final do processo de fermentação, remove-se a levedura do mosto fermentado e prepara-se com estas uma nova inoculação, para a próxima batelada. No entanto, como durante o processo de fermentação ocorre a multiplicação do levedo, gera-se um excedente deste material a cada batelada, que necessita de um destino adequado. Adicionalmente, a reutilização das células ocorre no máximo por cinco ciclos, isto é, enquanto não houver redução da viabilidade celular em níveis que levem à baixa rentabilidade do processo fermentativo. Nesta fase, todas as células presentes no reator são descartadas (PINHEIRO-ROBERG, 2000).

Em geral, dado o valor nutricional da biomassa, as cervejarias vendem-na para as indústrias de rações e alimentos. As células de levedura, inativadas termicamente ou não, podem ser usadas diretamente como células íntegras de levedura ou ser processadas para obtenção de vários derivados. As células íntegras são usadas principalmente na alimentação animal, enquanto certos derivados, como o autolisado e o extrato de levedura, vêm sendo utilizados na formulação de produtos para consumo humano, ou como complemento nutritivo e aromatizante e potencializador de sabor (CABRAL FILHO, 1999).

As células de levedura apresentam alto teor protéico, entre 30 a 70%, e são ricas em vitaminas, particularmente do complexo B (B_1, B_2, B_6, ácido pantotênico, niacina, ácido fólico e biotina), e em minerais essenciais, macro e microelementos, particularmente selênio e fibra dietética, representados por carboidratos da parede celular, principalmente mananas e glicanas (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991). O valor nutritivo das proteínas é considerado bom, correspondendo a 70 - 85% do valor da caseína (CABALLERO-CÓRDOBA *et al.*, 1997). No entanto, apresenta baixos níveis de aminoácidos sulfurados, metionina e cisteina (KINSELLA & SHETTY, 1978,

VANANUVAT, 1977, WALSIEN, 1975). Outros problemas restritivos ao uso de leveduras na alimentação humana e de animais monogástricos em geral está relacionado com a rigidez da sua parede celular e ao elevado teor de ácidos nucléicos, particularmente RNA, (WALSIEN *et al.*, 1970, SHETTY & KINSELLA, 1982). Tem-se que a ingestão de células de leveduras secas, acima de 30 g, ou ácidos nucléicos acima de 2 g por dia, pode elevar a concentração de ácido úrico no sangue, resultando em cálculos renais e/ou gota, em humanos (WALSIEN *et al.*, 1970).

Ademais, nem sempre a procura atende a quantidade de rejeito gerado, o que acarreta em grande acúmulo.

Por outro lado, considerando o volume gerado e o alto teor orgânico da levedura (120.000 a 140.000 mg DBO/L), o descarte da biomassa cervejeira só pode ser efetuado após um adequado tratamento, o que representa um ônus considerável para a cervejaria. Por isso, é de interesse desenvolver tecnologias que permitam obter produtos de alto valor agregado a partir deste rejeito cervejeiro (FURCO, 1996).

No Brasil, o resíduo cervejeiro é comercializado na forma úmida e, que normalmente é estocado por períodos de 20 a 30 dias. A elevada quantidade de água no resíduo úmido pode resultar em outros fatores limitantes como a dificuldade no transporte a longas distâncias, dificuldades no armazenamento, ataque de microrganismos, principalmente fungos. Uma das práticas adotadas, na maioria das vezes, é a adição de sal comum (NaCl) na tentativa de minimizar o ataque de microrganismos. Outra possibilidade praticada em muitos países é a desidratação parcial do resíduo que minimiza os problemas de contaminação. Entretanto, o processo para secagem representa um custo adicional (SGARBIERI *et al*, 1999).

2.5. Surfactantes

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais (NISTCHKE & PASTORE, 2002). De fato, o mercado mundial de surfactantes movimenta, anualmente, cerca de 9,4 bilhões de dólares, com estimativa de crescimento de 35% ao ano (KIM *et al.*, 2000).

Os surfactantes são moléculas anfipáticas, constituídas de uma fração polar ou hidrofílica e uma fração apolar ou hidrofóbica (TADROS, 1987; GEORGIOU *et al.*, 1992). A porção apolar é freqüentemente formada por hidrocarbonetos de cadeias alifáticas, grupos aromáticos ou policíclicos. Esta parte da molécula tem uma baixa

solubilidade em água devido ao "efeito hidrofóbico", provocado não tanto pela atração entre grupos apolares, mas principalmente pela dificuldade em romper as fortes interações entre as moléculas de água (HELENIUS & SIMONS, 1975; LICHTENBERG *et al.*, 1983).

A porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica. Alguns exemplos de surfactantes iônicos utilizados comercialmente incluem ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônicos) (DESAI & BANAT, 1997; NISTCHKE & PASTORE, 2002).

Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). Essas propriedades conferem aos surfactantes a capacidade de reduzir a tensão interfacial e a tensão superficial através da formação de um filme molecular entre duas fases não miscíveis. Esses compostos podem ainda formar emulsões estáveis de hidrocarbonetos em água ou de água em hidrocarbonetos. Além da atividade emulsificante, o uso dos surfactantes é garantido por outras propriedades, tais como: formação de micelas, formação de macro e microemulsões, adsorção, dispersão ou agregação de sólidos, ação espumante ou anti-espumante, solubilidade, solubilização, molhabilidade ou detergência (PORTER, 1994; DESAI & BANAT, 1997; NISTCHKE & PASTORE, 2002).

A solubilidade dos surfactantes é responsável por sua adsorção à superfície de líquidos e a formação de micelas, que por sua vez propicia a redução da viscosidade e solubilização de compostos no meio. Por outro lado, a adsorção dos surfactantes resulta em molhabilidade, emulsificação, formação de espumas, dispersão de partículas e detergência. Estas propriedades permitem que os surfactantes possam ter uma ampla aplicação nos mais diferentes setores industriais (DESAI & BANAT, 1997; NISTCHKE & PASTORE, 2002).

A principal característica de um agente tensoativo é a de formar concentrações diferenciadas quando em solução, sendo a concentração do surfactante na superfície muito maior do que no seio do líquido (PORTER, 1994). No interior do líquido as moléculas são atraídas igualmente em todas as direções, sendo a distância média entre elas resultante do balanço entre forças atrativas, que possibilitam a aproximação das moléculas, e forças repulsivas, que impedem que duas moléculas ocupem o mesmo espaço, conforme observado na Figura 2.5. Por outro lado, as moléculas na superfície livre do líquido apresentam forças diferenciadas resultando em um comportamento

distinto. Neste caso, as moléculas praticamente não apresentam forças atrativas dirigidas para fora do líquido, conseqüentemente sendo atraídas em direção ao seio do líquido. Do mesmo modo, num sistema constituído por dois líquidos imiscíveis, tem-se que as moléculas presentes na interface sofrem forças de atração para o líquido de maior densidade (BRADY & HUMISTON, 1981).

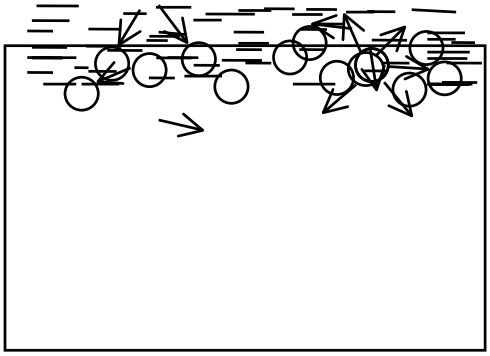


Figura 2.5. Ilustração das forças atrativas intermoleculares de moléculas na superfície e no seio do líquido (BRADY & HUMISTON, 1981).

A intensidade de adsorção de um surfactante a uma superfície depende da sua concentração. Conforme ilustrado na Figura 2.6, concentrações crescentes do surfactante ocasionam variação na ordenação das moléculas deste composto sobre superfícies. Em concentrações muito baixas de surfactante, as moléculas se distribuem na superfície e tendem a se orientar paralelamente a esta. Com o aumento da concentração do surfactante, diminui a área disponível para as moléculas e, por conseguinte, tem início uma ligeira ordenação das mesmas em relação à superfície. A orientação das moléculas depende, sobretudo, da natureza hidrofílica/hidrofóbica da superfície. Numa determinada concentração, denominada concentração micelar crítica (CMC), a quantidade disponível de moléculas do surfactante propicia a formação de uma única camada unidirecional (LUCAS, 1988).

As micelas são definidas como agregados moleculares, com regiões estruturais hidrofílicas e hidrofóbicas, que dinâmica e espontaneamente se associam em meio aquoso, a partir de uma determinada concentração crítica (CMC - concentração micelar crítica), formando grandes agregados moleculares de dimensões coloidais. Abaixo da CMC, o tensoativo está predominantemente na forma monomérica (HINZEL, 1979). As

micelas são termodinamicamente estáveis, mas são destruídas pela diluição com água, quando a concentração do tensoativo fica abaixo da CMC (PELIZZETI, 1987).

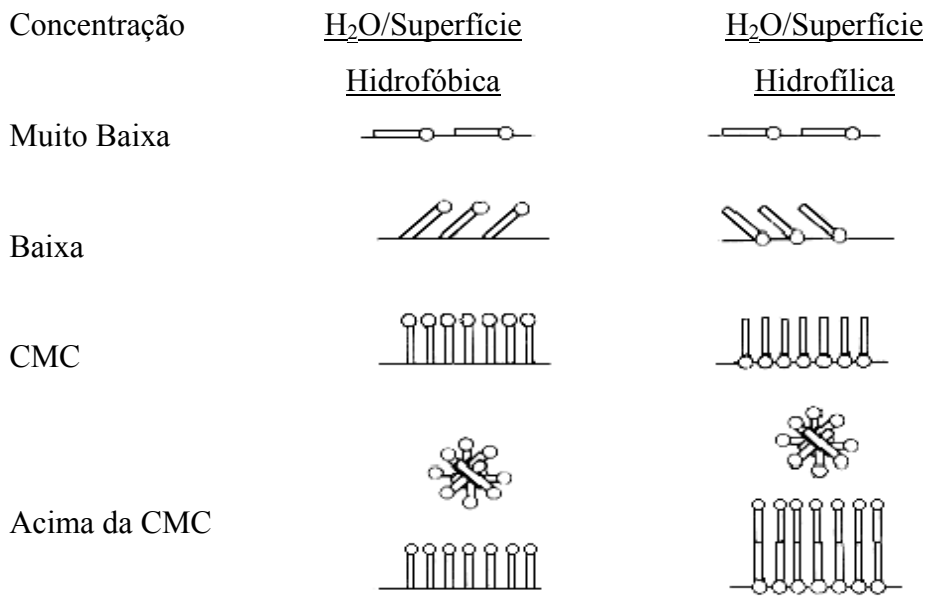


Figura 2.6. Representação do efeito da concentração de um surfactante na adsorção em superfícies (PORTER, 1994).

Segundo Rosen (1989), pequenas quantidades de material orgânico podem produzir mudanças significativas na CMC, em meio aquoso. Estas impurezas, que podem estar presentes na forma de subprodutos da manufatura de surfactantes, podem causar diferenças expressivas entre compostos comerciais supostamente similares. Desta forma, estudar os efeitos produzidos por estes materiais na CMC é de grande importância. Segundo o autor, há duas classes de materiais que afetam as concentrações micelares críticas: classe 1, por incorporação na micela; classe 2, pela modificação das interações solvente-micela ou solvente-surfactante.

A tensão superficial de um líquido pode ser definida como a quantidade de trabalho (força por unidade de comprimento) necessária para expandir o filme na superfície líquido-gás. Esta quantidade de trabalho é dependente da intensidade das forças das moléculas dirigidas para o interior do líquido. A tensão superficial também depende da temperatura do líquido, já que um aumento da temperatura, que propicia um aumento da energia cinética das moléculas individualmente, reduz as forças atrativas intermoleculares. Como conseqüência, tem-se um decréscimo da tensão superficial com

o aumento da temperatura (BRADY & HUMISTON, 1981). A mesma explanação é atribuída para tensão interfacial que, no entanto, representa interação entre líquidos.

Estudos realizados por Parra *et al.* (1989) demonstraram a dependência dos valores de atividade superficial de biossurfactante com relação ao pH do meio aquoso. Os experimentos demonstraram que em pH 3,0, a CMC diminuiu para 5,5 ppm, enquanto que no pH 7,0, o valor foi de 11 ppm.

As medidas de tensão superficial e interfacial de líquidos e de soluções aquosas e orgânicas contendo tensoativos podem facilmente serem feitas utilizando um tensiômetro Du Nouy. A adição de um bom surfactante na água pode diminuir as tensões superficial e interfacial a 20°C de 72,8 para 30 mN/m e de 50,1 para 1,0 mN/m, em sistema n-octano/água, respectivamente (KOSARIC *et al.*, 1983; DESAI & BANAT, 1997).

Os surfactantes quimicamente sintetizados têm sido usados na indústria do óleo cru, como auxiliares no tratamento despoluente de ambientes acometidos por derrames de petróleo, bem como na recuperação terciária de óleo de reservatórios. Porém, estes compostos não são biodegradáveis e podem ser tóxicos para o ecossistema (SERKER *et al.*, 1989 *apud* BANAT, 1995). Adicionalmente, os surfactantes apresentam aplicação industrial, em grande escala, em produtos de uso pessoal, regularmente utilizado por bilhões de pessoas em todo o mundo. A ingestão acidental, nem que seja de pequenas quantidades destes surfactantes, é impossível evitar, uma vez que estes são constituintes de produtos como cremes dentais e cosméticos, cuja utilização freqüente pode acarretar na sua absorção. Por isso, muitos dos surfactantes usados comercialmente têm sido estudados com rigor quanto ao possível efeito tóxico a seres humanos (PORTER, 1994).

Os surfactantes apresentam diferentes graus de toxicidade, destacando-se os compostos catiônicos como os mais nocivos. Normalmente, também apresentam acentuada atividade bactericida. Em menor grau, encontram-se os compostos aniônicos seguidos dos não-iônicos, os quais apresentam variação de toxicidade em função de sua estrutura química (KANTIN, 1980). Os compostos tensoativos agem sobre a membrana citoplasmática desnaturando as proteínas celulares e, conseqüentemente, alterando o equilíbrio osmótico. A toxicidade está provavelmente relacionada à estrutura molecular, pois moléculas contendo cadeias ramificadas, com número de átomos de carbono maior que 16, ou anéis aromáticos, são as mais tóxicas (KANTIN, 1980).

A grande maioria dos surfactantes comercialmente disponíveis é sintetizada a partir de derivados de petróleo (DESAI & BANAT, 1997; NISTCHKE & PASTORE,

2002). Contudo, o custo variável do petróleo e a possibilidade do seu esgotamento vem estimulando a busca por tecnologias alternativas que possibilitem a produção comercial de agentes tensoativos biodegradáveis a custo competitivo. Uma possibilidade seria a obtenção por via microbiana, uma vez que algumas espécies são capazes de acumular grande quantidade de compostos com propriedades tensoativas (KOSARIC *et al*., 1983).

2.6. Emulsificantes

A emulsificação, formação de emulsões entre duas fases líquidas imiscíveis, é, provavelmente, a propriedade mais versátil dos agentes tensoativos para aplicações práticas e, por isso, tem sido extensivamente estudada (ROSEN, 1989). Emulsificação é a dispersão de um líquido em outro, consistindo em gotas microscópicas que variam de tamanho entre 0,1 e 100 nm de diâmetro. Geralmente, quanto menor o diâmetro das gotículas, mais estável será a emulsão formada (ZAJIC & SEFFENS, 1984)

Dois líquidos imiscíveis não podem formar emulsões. Neste caso, para promover a dispersão de um líquido em outro, deve ser adicionado um terceiro componente capaz de estabilizar o sistema. Este componente é chamado de agente emulsificante e, usualmente, é um agente tensoativo. Este agente não precisa ser constituído por uma única substância e, de fato, os emulsificantes mais eficientes são normalmente misturas de uma ou duas substâncias (ROSEN, 1989).

Shepherd *et al.* (1995) estudaram a produção de agentes emulsificantes por microrganismos para serem utilizados no processamento de alimentos. Para tanto, um experimento padrão de emulsificação, desenvolvido especificamente para avaliar emulsificantes de alimentos, foi utilizado para examinar 24 produtos microbianos extracelulares de bactérias, levedura e algas. Dos 24 produtos testados, cerca de 71% apresentaram capacidade emulsificante, dos quais 9 com atividade semelhante aos emulsificantes normalmente utilizados em alimentos, como goma arábica e carboximetilcelulose; sendo que os outros 8 apresentaram um efeito ainda melhor.

2.7. Biossurfactantes

Os compostos de origem microbiana com propriedades surfactantes, isto é, com capacidade de diminuir a tensão superficial e promover a emulsificação de líquidos

imiscíveis, são denominados biossurfactantes. Em geral, esses compostos são subprodutos do metabolismo de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Esses microrganismos produzem as moléculas de biossurfactantes utilizando vários substratos incluindo açúcares, hidrocarbonetos, e resíduos agroindustriais (NITSCHKE & PASTORE, 2002; MESQUITA, 2004).

Os biossurfactantes podem ser intra, extracelulares ou constituintes da parede celular (BERTRAND *et al.*, 1994). A maioria destes compostos apresenta natureza lipídica. Ademais, os biossurfactantes apresentam propriedades semelhantes aos surfactantes sintéticos, por apresentarem também, na mesma molécula, grupos polares e apolares (COOPER & ZAJIC, 1980). Em geral, o grupo hidrofóbico é constituído por longas cadeias de ácidos graxos, hidroxilados ou não, e seus derivados como ácidos α-alquil-β-hidroxi-graxos. A fração hidrofilica na molécula pode ser devido à presença de carboidratos, aminoácidos, peptídeos cíclicos, fosfato, ácidos carboxílicos, álcoois, ésteres, entre outros (PARRA *et al.*, 1989).

Muitas vezes, a célula microbiana, por si só, pode demonstrar significante capacidade emulsificante e se comportar como um biossurfactante. Em adição, a ação solvente do hidrocarboneto na superfície lipofilica da célula pode causar uma perda de sua integridade estrutural, liberando componentes tensoativos no meio. Muitos autores consideram que a célula intacta possuidora de capacidade emulsificante é por si só um biossurfactante, porém, apenas os biossurfactantes extracelulares têm o poder de reduzir a tensão superficial de uma fase aquosa (FRANCY *et al.*, 1991).

Os biossurfactantes podem apresentar baixo ou alto peso molecular. Os biossurfactantes de baixo peso molecular apresentam uma maior eficiência em reduzir a tensão superficial e interfacial de meios líquidos, enquanto os surfactantes de alto peso molecular demonstram uma maior eficiência em estabilizar emulsões óleo/água (ROSENBERG & RON, 1999). Pode-se, portanto, definir os biossurfactantes como compostos biodegradáveis que, em muitos casos, possui propriedade emulsificante equivalente aos compostos químicos (SARKER *et al.,* 1989 *apud* BANAT, 1995). Assim, os biossurfactantes emulsificam hidrocarbonetos, aumentando sua solubilidade em água, diminuindo a tensão interfacial e aumentando o deslocamento das substâncias oleosas agregadas às partículas do solo (BANAT, 1995; BANAT, 2000).

Os surfactantes produzidos microbiologicamente oferecem várias vantagens sobre seus equivalentes químicos, gerando novas possibilidades para aplicação industrial (PARRA *et al.*, 1989). Entretanto, a vantagem mais importante dos

biossurfactantes é a de serem produtos ecologicamente corretos, o que está diretamente relacionada com a sua aceitação pelos consumidores. Além da biodegradabilidade, tem-se a possibilidade de produzi-los a partir de substratos renováveis, ou até mesmo, de rejeitos agroindustriais (FIECHTER, 1992; ROSENBERG *et al.*, 1999; BANAT *et al.*, 2002; REIS *et al*., 2004).

Esses compostos podem possuir diferentes estruturas químicas e propriedades de superfície uma vez que podem ser produzidos por uma grande variedade de microrganismos em diferentes condições nutricionais e ambientais. Com base na diversidade dos biossurfactantes é razoável que apresentem diferentes aplicações especificas permitindo seu uso potencial nos mais variados setores da indústria, como já mencionado (ROSENBERG & RON, 1999).

A produção destes tensoativos ainda não é economicamente vantajosa, quando comparada com os equivalentes sintéticos. Por isso, o interesse no emprego de matérias-primas mais baratas, como os resíduos agroindustriais ou fontes renováveis contendo hidratos de carbono e/ou lipídeos (MERCADE *et al*, 1994). Porém, há que se definir o balanço correto dos componentes do meio a fim de propiciar a obtenção de altos rendimentos e produtividades do processo a partir de matérias-primas de baixo valor econômico.

2.8. Classificação e natureza química dos biossurfactantes

Os biossurfactantes constituem uma das mais importantes classes de surfactantes naturais, sendo classificados de acordo com sua natureza bioquímica e pela sua origem microbiana, ao contrário dos surfactantes sintéticos, os quais são geralmente classificados de acordo com a natureza do seu grupo polar. Na Tabela 2.2 estão descritos os principais surfactantes de origem natural e sintética.

De acordo com seus constituintes os biossurfactantes podem ser agrupados nas seguintes classes: glicolipídeos, lipopeptídeos, ácidos graxos, lipídeos neutros, fosfolipídeos e biossurfactantes poliméricos (ZAJIC & STEFFENS, 1984; HOMMEL, 1990; GEORGIOU *et al*., 1992; DESAI & BANAT, 1997).

Tabela 2.2. Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

NATURAIS	SINTÉTICOS
Alquil poliglicosídeos	Alcanolaminas
Biossurfactantes	Alquil e aril éter carboxilados
Amidas de ácidos graxos	Alquil aril sulfatos
Aminas de ácidos graxos	Alquil aril éter sulfatos
Glucamidas	Alquil etoxilados
Lecitinas	Alquil sulfonados
Derivados de proteínas	Alquil fenol etoxilados
Saponinas	Aminoóxidos
Sorbitol e ésteres de sorbitan	Bataínas
Ésteres de sacarose	Co-polimeros de óxido de etil/propileno
Sulfatos de álcoois graxos naturais	Ácidos graxos etoxilados

A seguir uma breve descrição dos biossurfactantes mais investigados, dando maior ênfase ao biossurfactante "alvo" deste estudo:

2.8.1. Glicolipídeos

Os glicolipídeos são os surfactantes microbianos mais conhecidos. Estes compostos são constituídos por carboidratos associados a uma longa cadeia de ácidos alifáticos ou hidroxi-alifáticos (DESAI & BANAT, 1997). Uma determinada espécie microbiana é capaz de produzir diferentes tipos de glicolipídeos, dependendo da fonte de carbono disponível para seu crescimento (ZAJIC & STEFFANS, 1984). Dentre os glicolipídeos mais conhecidos, podem ser citados os raminolipídeos, trealoselipídeos e soforoselipídeos (DESAI & BANAT, 1997).

Considerando a síntese de glicolipídeos, que constituem o maior grupo entre os biotensoativos, quatro caminhos biossintéticos são possíveis, segundo SYLDATK & WAGNER (1987): (1) síntese das metades hidrofílica e hidrofóbica; (2) a metade hidrofílica é sintetizada enquanto a síntese da metade hidrofóbica é induzida pelo substrato; (3) a metade hidrofóbica é sintetizada enquanto a síntese da metade hidrofílica é induzida pelo substrato e (4) a síntese de ambas as metades depende do substrato. Os raminolipídeos estão entre os glicolipídeos mais estudados.

Os dois principais raminolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* em culturas líquidas são ramnosil-b-hidroxidecanoil-b-hidroxidecanoato (Rha-C10-C10) e

ramnosil--ramnosil--b-hidroxidecanoil-b-hidroxidecanoato (Rha-Rha-C10-C10) (DÉZIEL *et al*, 1999; MAIER & SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000).

A síntese de raminolipídeos resulta de uma série de reações de transferência do grupo glicosil, cada uma catalisada por uma raminosil transferase específica, com a tidiminadifosfato-L-raminose (TDP-raminose) agindo como um doador de raminose e os monoraminolipídeos agindo como os respectivos receptores (MAIER & SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000). Na Figura 2.7 está representada a seqüência de reações que resultam na síntese de raminolipídeos, de acordo com OCHSNER *et al.*, (1995).

Nos últimos anos, algumas publicações têm indicado que os raminolipídeos designados por 1(R1) e 2(R2) são, na realidade, produzidos como parte de uma mistura complexa de raminolipídeos. Estes compostos contêm uma ou duas moléculas de raminose ligadas a uma ou duas moléculas de hidroxi ácidos graxos com diferentes comprimentos de cadeia, que podem conter uma dupla ligação. As diversas combinações destes grupos geram um grande número de possíveis homólogos (DÉZIEL *et al.*, 1999). Novas técnicas analíticas têm sido aplicadas no estudo de raminolipídeos microbianos, e mais de 28 homólogos já foram detectados (ABALOS *et al.*, 2001). A Figura 2.8 representa a estrutura geral de raminolipídeos produzidos pelo gênero *Pseudomonas*.

Enquanto os raminolipídeos 1 e 2 são principalmente produzidos em culturas líquidas, o raminolipídeo 3, contendo duas moléculas de raminose e um ácido graxo, e o raminolipídeo 4, constituído por uma molécula de raminose e um ácido graxo, parecem ser produzidos por células em condições não proliferantes (KOCH *et al.*, 1991).

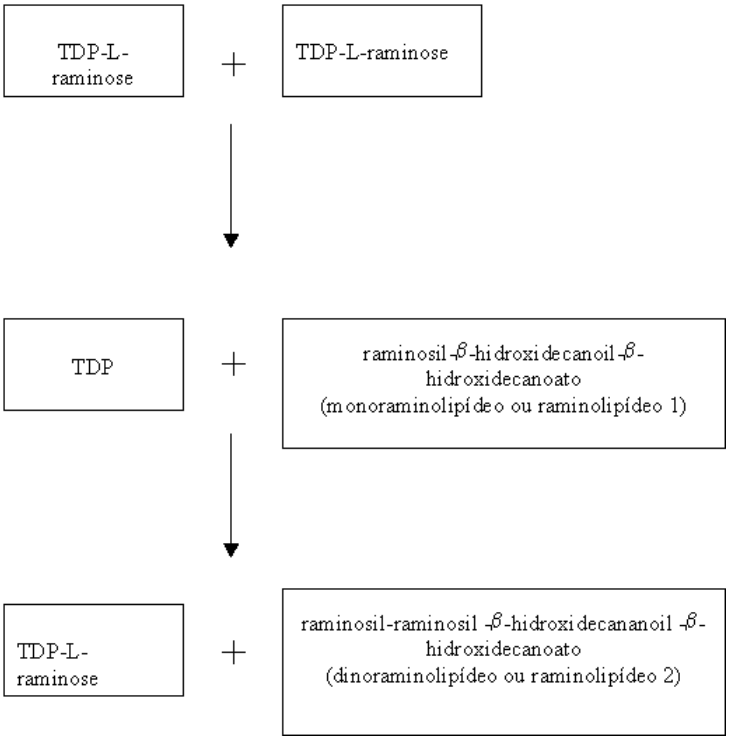


Figura 2.7. Biossíntese de raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* (OSHNER *et al.*, 1996).

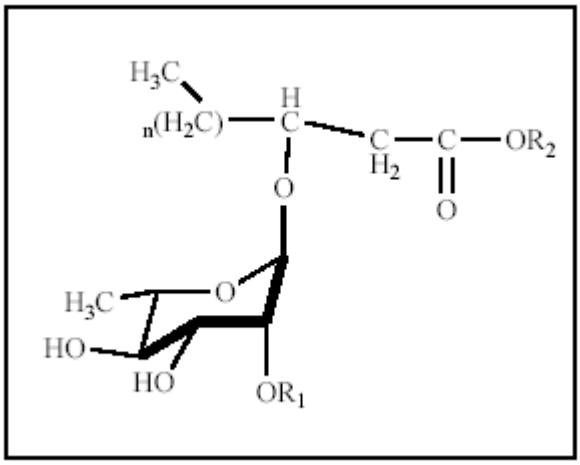


Figura 2.8. Estrutura química da molécula de raminolipídeos (ABALOS *et al*, 2001).

R1 = H2 (monoraminolipídeos) ou a-L- ramnopiranosil (diraminolipídeos).

R2 = cadeia hidrocarbonada saturada ou insaturada com C8 – C12.

Estruturas diferenciadas de raminolipídeos, contendo ácidos hidroxigraxos com variados tamanhos de cadeias (C_8, C_{12}), têm sido descritos como produtos obtidos pelo

crescimento de linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* da área clínica (RENDELL *et al.*, 1990). A grande variedade estrutural dos raminolipídeos está relacionada à variabilidade das cepas bem como às condições de cultivo como, por exemplo, o crescimento em aerobiose ou anaerobiose, imobilização bacteriana, uso de *resting cells*, idade da cultura e variação de substratos (MATA-SANDOVAL *et al.*, 1999; LANG & WULLBRANDT, 1999).

Santos *et al.* (2002) estudaram a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, em distintos valores de pH na estrutura molecular dos raminolipídeos, a partir de fermentações empregando a linhagem *Pseudomonas aeruginosa* PA1. Os autores observaram que o emprego de glicerol, como única fonte de carbono, proporcionou maior quantidade de raminolipídeos do tipo R2 (cerca de 80%) e do tipo R1 (17%) em relação às demais fontes de carbono estudadas (etanol, e óleos de soja e de oliva). Por outro lado, as fontes de nitrogênio testadas (extratos de levedo, sulfato de amônio e nitrato de sódio), não tiveram influência nas proporções dos raminolipídeos sintetizados. Ainda segundo os autores, a quantidade de R1 produzido foi menor do que a quantidade de R2 em valores de pH menores que 7,0. Em valores de pH superiores a 7,0, as quantidades de R1 e R2 foram equivalentes. As diferenças nas proporções entre os tipos de raminolipídeos sintetizados podem afetar as características do produto final, como a concentração micelar crítica (CMC) e suas propriedades surfactantes (atividade emulsificante e tensão superficial), o que irá definir sua posterior aplicação (MATA-SANDOVAL *et al.*, 1999; CHRISTOFI & IVSHINA, 2002). Desta forma, dependendo da aplicação que se queira dar ao produto, as concentrações relativas dos raminolipídeos nele presentes poderão ser modificadas com a escolha apropriada da fonte de carbono e do pH do meio de cultivo.

Os raminolipídeos, assim como outros biossurfactantes, favorecem o crescimento de microrganismos a partir de fontes de carbono hidrofóbicas como os hidrocarbonetos (COOPER & ZAJIC, 1980). ITOH & SUZUKI (1971) *apud* DESAI & BANAT (1997) realizaram o cultivo de duas linhagens mutantes de *Pseudomonas aeruginosa*, deficientes em enzimas responsáveis pela síntese de raminolipídeos, em meio de cultura contendo alcanos como única fonte de carbono. Nas condições ensaiadas, o crescimento destas culturas bacterianas só foi possível quando os cultivos foram suplementados com raminolipídeos. Posteriormente, outros autores, estudando a degradação de hidrocarbonetos do solo, determinaram ser este surfactante essencial para

mineralização de hidrocarbonetos alifáticos (OBERBREMER *et al*., 1990; ZANG & MILLER, 1992; JAIN *et al*., 1992; VAN DYKE *et al*., 1993).

Mercade *et al*. (1993) estudaram a produção de biossurfactante a partir de efluente gerado nos moinhos da extração do óleo de oliva. Nas condições ensaiadas, observaram que diferentes espécies de *Pseudomonas* foram capazes de crescer a partir desta matéria-prima, ocorrendo também produção de raminolipídeos. Estes foram capazes de reduzir a tensão superficial e a tensão interfacial de 42,0 e 30,0 para 1,0 mN/m respectivamente, indicativo da presença de alta concentração de raminolipídeos.

Fernandes *et al.* (2005) estudaram a possibilidade de se utilizar resíduos provenientes do processamento de óleo de girassol, água residuária e *soapstock* (produto composto por mistura de ácidos graxos), como matéria-prima para a obtenção de raminolipídeos através do cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* LBI. Como resultados, encontraram uma produção máxima de 12,1 g/L de raminolipídeos após 48 horas de fermentação utilizando um meio rico em sais minerais, vitaminas e proteínas e 6,1 g/L de raminolipídeo empregando um meio com apenas *soapstock,* água residuária e 4,0 g/L de nitrato de sódio. Os autores consideraram este último como o melhor resultado obtido.

É também possível obter raminolipídeos a partir da atividade de microrganismos em meios contendo exclusivamente fontes de carbono solúveis (MARCADÉ *et al*, 1993; YAMAGUCHI, *et al*., 1999; SANTOS *et al*, 2002). De fato, muitos estudos têm sido realizados para determinar qual a melhor fonte de carbono, nitrogênio, fosfato e ferro, quali e quantitativamente, para aumentar o desempenho do bioprocesso (OCHSNER & REISER, 1995).

Algumas espécies de *Pseudomonas* produzem raminolipídeos que, adicionados a sistema óleo/água, são capazes de reduzir a tensão interfacial de 21,0 para 0,47 mN/m (PERSSON *et al*., 1988; PARRA *et al*., 1989; PATEL & DESAI, 1997).

Trealoselipídeos são principalmente produzidos por actinomicetos (COOPER & ZAJIC, 1980; ZAJIC & SEFFENS, 1984; DESAI, 1987). Os trealoselipídeos sintetizados por diferentes espécies de actinomicetos diferem quanto ao tamanho, podendo apresentar de 60 a 90 átomos de carbono, tipo de estrutura e grau de insaturação do ácido micólico. Por sua vez, a composição e o grau de esterificação do ácido micólico são influenciados pelas condições de cultivo (COOPER & ZAJIC, 1980; DESAI, 1987).

Muitos tipos estruturais desse grupo de biossurfactantes têm sido reportados na literatura. Estes compostos são constituídos de 2 moléculas de ácido β-hidroxicarboxílico de cadeia longa e ramificada (ácido micólico) ligadas, através de ligação éster, aos grupamentos hidroxila dos átomos de carbono 6 e 6' do dissacarídeo (Figura 2.9) (DESAI & BANAT, 1997; BOGNOLO, 1999; KARANTH *et al.*, 1999). Conforme citado por DESAI & BANAT (1997), os trealoselipídeos estão interligados na parede celular, podendo ser facilmente extraídos com n-hexano.

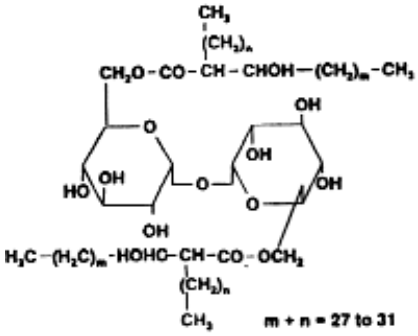


Figura 2.9. Estrutura de trealoselipídeo produzido por *Rhodococcus erythropolis* (DESAI & BANAT, 1997).

Soforoselipídeos são produzidos por leveduras, principalmente por espécies do gênero *Torulopsis* como *T. bombicola*, *T. petrophilum* e *T. apicola* (DESAI & BANAT, 1997). Este biossurfactante consiste do dissacarídeo soforose, acetilado nos átomos de carbono 6 e 6', ligado a uma longa cadeia de ácido graxo hidroxilado, conforme observado na Figura 2.10. Na realidade, células de *Torulopsis* sp. excretam uma mistura de no mínimo 6 a 9 diferentes tipos de soforoselipídeos de caráter altamente hidrofóbico (ITOH & INOUE, 1982; COOPER & PADDOCK, 1984).

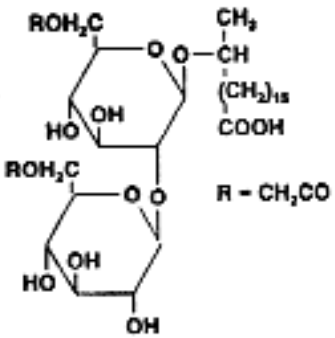


Figura 2.10. Estrutura do soforoselipídeo produzido por *Torulopsis bombicola* (DESAI & BANAT, 1997).

COOPER & PADDOCK (1983) demonstraram a produção de soforoselipídeos por *T. petrophilum* em meio contendo substratos insolúveis em água, como alcanos e óleos vegetais. Estes compostos, embora quimicamente idênticos aos produzidos por *T. bombicola*, não promoveram a emulsificação de sistemas alcano/água e óleo vegetal/água. Entretanto, quando a levedura *T. petrophilum* foi cultivada em meio contendo glicose e extrato de lêvedo não ocorreu produção de soforolipídeo, mas sim de uma proteína com potente ação emulsificante. Estes resultados contradizem o conceito já estabelecido de que biossurfactantes com ação emulsificante são produzidos para favorecer a atividade metabólica de microrganismos em substratos insolúveis em água. Estes compostos não apresentam propriedades emulsificantes, mas são eficientes em reduzir as tensões superficial e interfacial. O emprego de soforoselipídeos resultou na redução da tensão interfacial de sistema n-hexano/água de 40 para 5 mN/m. Ademais, destaca-se a acentuada estabilidade destes compostos em diferentes valores de pH e temperatura (COOPER & PADDOCK, 1983; DESAI & BANAT, 1997).

Deshpande e Daniels (1995) realizaram a avaliação da produção de soforoselipídios por *Candida bombicola* usando como fontes de carbono glicose e gordura animal, e milhocina como fonte de vitaminas e sais minerais. Nas condições de fermentação de 0,5 vvm de aeração, 30 °C, 400 rpm, e 72 horas, foram atingidos os valores máximos de biomassa (38 g/L) e de soforoselipídio (129,8 g/L).

2.8.2. Lipopeptídeos e lipoproteínas

Um grande número de lipopeptídeos com propriedades tensoativas tem sido reportado na literatura (ZAJIC & SEFFENS, 1984; FIETCHER, 1992; DESAI & BANAT, 1997). Estes compostos são sintetizados principalmente por bactérias, também existindo alguns relatos de sua obtenção por actinomicetos e leveduras (ZAJIC & SEFFENS, 1984).

Os lipopeptídeos produzidos por diferentes espécies do gênero *Bacillus* são particularmente interessantes devido à sua alta eficiência como agentes tensoativos, alguns também apresentando atividade antimicrobiana (HOROWITZ *et al.*, 1990; ULLRICH *et al.*, 1991; FIECHTER, 1992). Deve-se mencionar que existem lipopeptídeos cuja ação tensoativa ainda não foi detectada, podendo-se citar micosubtilisina, bacilomicina, polimixina, subsporina, polipeptina e brevistina que só

apresentam atividade bactericida e/ou fungicida, (HOROWITZ *et al*., 1990; ULLRICH *et al*., 1991; FIECHTER, 1992).

Os lipopeptídeos cíclicos, com suas estruturas complexas, mantêm várias atividades biológicas como um antibactericida ou atividade antiviral, atividade citológica entre outras (VOLLBRECHT, 1998).

A surfactina, um lipopeptídeo produzido por algumas linhagens de *B. subtilis*, também denominada de subtilisina ou serolisina, é um dos mais efetivos biossurfactantes conhecidos (ARIMA *et al*., 1968; COOPER *et al*., 1981; DESAI & BANAT, 1997; MAKKAR & CAMEOTRA, 1997; REIS *et al*., 2004). Este composto foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27,9 dina/cm (FOX *et al.*, 1993). A caracterização da surfactina demonstrou ser este composto um lipopeptídeo cíclico, formado por uma cadeia contendo 7 aminoácidos, com suas extremidades covalentemente ligadas aos grupamentos carboxila e hidroxila de um ácido graxo β-hidroxilado (Figura 2.11).

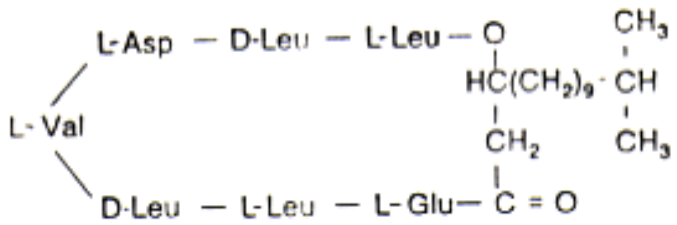


Figura 2.11. Estrutura da surfactina produzida por *Bacillus subtilis* (DESAI & BANAT, 1997).

Como outras características importantes destes compostos, podem ser citadas a capacidade de lisar eritrócitos e a de induzir a formação de esferoplastos (ARIMA *et al*., 1968; BERNHEIMER & AVIGAD, 1970). Por isso, a produção de surfactina pode ser detectada através de hemólise cultivando-se a bactéria em agar sangue (DESAI & BANAT, 1997).

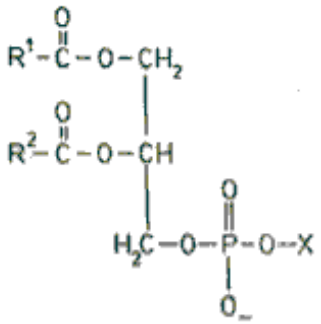
Como exemplo de outros microrganismos produtores de lipopeptídeos pode-se citar *Pseudomonas rubescens*, que produz um composto com atividade emulsificante, constituído de lipídeo associado a um único aminoácido, a ornitina. Este composto contém um ácido β-hidrocarboxílico unido a um ácido carboxílico simples através de ligação éster. (WILKINSON *et al.*, 1972 *apud* COOPER & ZAJIC, 1980).

Corynebacterium lepus também produz um lipopeptídeo que é capaz de reduzir a tensão superficial da água destilada de 72 para 52 mN/m (COOPER *et al.*, 1984). Este lipopeptídeo é constituído de 35 % de proteína, 16% de ácidos graxos saturados e de 49 % de ácido micólico.

Artrofactina, composto produzido por *Artrobacter* sp., é um potente lipopeptídeo capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 24 mN/m. Outro exemplo de lipopeptídeo é a viscosina, produzida pela bactéria *Pseudomonas fluorescens*, que apresenta estrutura semelhante a artrofactina e é capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72,0 para 26,5 mN/m (MORIKAWA & DAIDO, 1993).

2.8.3. Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos

Normalmente, estes compostos são componentes estruturais das células microbianas. Por exemplo, os fosfolipídeos são os componentes principais das membranas dos microrganismos. Os fosfolipídeos são formados por uma molécula de glicerol unida a dois ácidos graxos, através de ligações éster, e a um grupamento fosfato que pode apresentar diferentes substituintes (ZAJIC & SEFFENS, 1984). Na Figura 2.12 está representada a estrutura genérica de um fosfolipídeo (COOPER & ZAJIC,1980).



R1 e R2-substituintes alquil;
X= H; CH_2NH_2;
$CH_2CH(NH_2)$-OOH;
$CH_2CHOHCH_2OH$;
$CH_2CHOHCH_2OPO_3$, etc.

Figura 2.12. Estrutura genérica de um fosfolipídeo (COOPER & ZAJIC, 1980).

Quando bactérias ou leveduras são crescidas em meio rico em hidrocarbonetos, o nível de fosfolipídeos nas células aumenta consideravelmente. Alguns desses fosfolipídeos têm um grande potencial biossurfactante (DESAI & BANAT, 1997; KARANTH *et al.*, 1999; BOGNOLO, 1999). Entretanto, algumas bactérias e leveduras excretam grandes quantidades de ácidos graxos e fosfolipídeos com potentes propriedades tensoativas, durante o crescimento na presença de n-alcanos (DESAI &

BANAT, 1997). De fato, os ácidos graxos produzidos a partir de alcanos por oxidação microbiológica têm recebido uma grande atenção como surfactantes (DESAI E BANAT, 1997; BOGNOLO, 1999; KARANTH *et al.*, 1999).

Muitos exemplos de produção de ácidos graxos ou lipídeos neutros envolvem microrganismos com crescimento em hidrocarbonetos. A bactéria *Micrococcus cerificans* produziu ácidos graxos extracelulares quando cultivada em hidrocarbonetos, o mesmo não ocorrendo para cultivos realizados em substratos solúveis (MAKULA & FINNERTY, 1972). Cooper & Zajic (1980) também obtiveram grande quantidade de lipídeos neutros extracelulares quando *Corynebacterium fascians* CF 15 foi cultivada na presença de alcano.

A bactéria *Acidithiobacillus thiooxidans* produz vários fosfolipídeos, tais como fosfatidilinositol, fosfatildiglicerol e ácido fosfatídico a partir de enxofre elementar. Estes compostos são importantes para o crescimento deste microrganismo (COOPER & ZAJIC, 1980). Entretanto, *Corynebacterium lepus* produz uma mistura de vários lipídeos, como o fosfatildiglicerol fosfato, cardiolipina e fosfatidilinositol-manosideo (COOPER *et al.*, 1981). Por sua vez, a bactéria *Micrococcus cerificans* produz, em diferentes condições de cultivo, diversas concentrações de fofolipídeos, tais como: fosfatidiletanolamina, fosfatidiglicerol, além dos mencionados anteriormente (MAKULA & FINNERTY, 1970 *apud* COOPER & ZAJIC, 1980).

A natureza e a quantidade relativa dos fosfolipídeos produzidos por microrganismos são influenciadas pelo tipo de substrato e pelas condições de cultivo. Por exemplo, a quantidade de fosfatidiletanolamina produzida por *Micrococcus cerificans* aumentou de 47,1 para 61,5% quando o substrato foi alterado de acetato para hexadecano, ambos os cultivos realizados em pH 7. Por outro lado, nestas condições, foi verificada redução nos teores de cardiolipina, fosfatidiglicerol-fosfato e fosfatidiglicerol. Enquanto que o cultivo da bactéria em hexano, em pH 2, resultou em um aumento mais acentuado de fostidiletanolamina, correspondendo a 86,8% dos fosfolipídeos totais produzidos (MAKULA e FINNERTY, 1970 *apud* COOPER e ZAJIC, 1980).

2.8.4. Biossurfactantes poliméricos

Muitos dos surfactantes microbiológicos são heteropolissacarídeos contendo proteínas ou ácidos carboxílicos (COOPER & PADDOCK, 1983. Os biossurfactantes

poliméricos mais bem estudados são os de nome comercial Emulsan, Alasan e Liposan, e mananoproteína (DESAI & BANAT, 1997; KARANTH *et al.*, 1999).

Estes compostos são freqüentemente referidos como biossurfactantes, embora o termo bioemulsificante seja o mais apropriado para sua denominação, considerando sua principal característica. Estas biomoléculas apresentam alta afinidade por interfaces óleo/água, desta forma propiciando a formação de emulsões estáveis (KOSARIC *et al.*, 1987).

Rosenberg *et al.* (1988) isolaram do solo duas linhagens de *Acinetobacter. calcoaceticus*, A2 e HD5, capazes de produzir compostos com atividade dispersante. Porém, ao contrário das outras 16 linhagens desta espécie, também isoladas do solo pelos autores, as linhagens A2 e HD5 não foram capazes de produzir emulsificantes.

Posteriormente, Navon-Venezia *et al.* (1995) caracterizaram um novo biossurfactante polimérico produzido por *A radioresistens* KA-53. Este biossurfactante, denominado Alasan, apresentou atividade 2,5 a 3 vezes maior, para uso em condições neutras ou alcalinas, após ter sido submetido à tratamento térmico a 100 °C.

Na Figura 2.13, observa-se a estrutura química do Emulsan, produzido pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* RAG1, Este composto apresenta peso molecular médio de 10^6 Da, e elevado poder emulsificante, mesmo em baixas concentrações, na faixa de 0,01 a 0,1 g/L (KAPLAN & ROSENBERG, 1982; DESAI & BANAT, 1997). Este produto é um heteropolissacarídeo aniônico, constituído de unidades quimicamente repetidas, formadas principalmente por açúcares aminados covalentemente ligados a ácidos graxos através de ligações *o*-ester (ZUCHERBERG *et al.*, 1979).

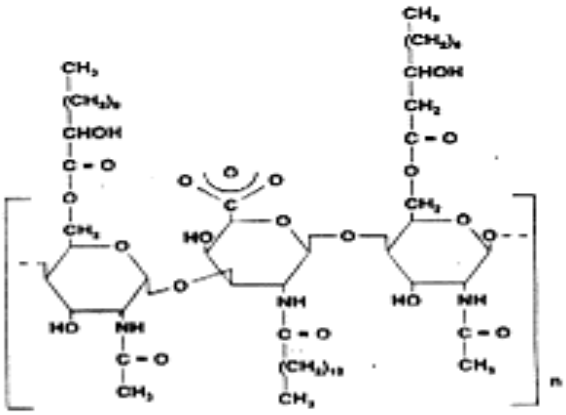


Figura 2.13. Estrutura do Emulsan produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* RAG1 (DESAI & BANAT, 1997).

Estudos realizados por Kappeli *et al.* (1986) mostraram que o cultivo de *Torulopsi. tropicalis* em meio de cultura contendo alcanos levava à obtenção de um complexo manana-ácido graxo com capacidade de estabilizar emulsões hexadecano/água.

Cirigliano & Carman (1984) obtiveram um outro produto extracelular pelo cultivo de *Torulopsis lipolytica* em alcanos, denominado Liposan. Este composto, constituído de 83% de carboidrato e 17% de proteína, é solúvel em água, estável na faixa de 70 a 100°C e apresenta atividade emulsificante máxima em valores de pH compreendidos entre 2 e 5.

Posteriormente, Cameron *et al.* (1988) demonstraram que *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de produzir grande quantidade de mananaproteína com acentuada atividade emulsificante sobre vários óleos vegetais e minerais, alcanos e solventes orgânicos. O emulsificante purificado apresentou peso molecular médio de 10.000 Da.

2.8.5. Outros tipos de biossurfactantes

Alguns trabalhos publicados na literatura reportam a existência de microvesículas extracelulares produzidas por bactérias do gênero *Acinetobacter* que captam e dispersam os hidrocarbonetos em pequenas gotículas, formando uma emulsão. Estas pequenas vesículas têm a mesma composição da membrana do microrganismo, porém contêm uma quantidade cinco vezes maior de fosfolipídeos e 350 vezes maior de polissacarídeos do que outras membranas do microrganismo (DESAI & BANAT, 1997; KARANTH *et al.*, 1999).

Células microbianas com alta hidrofobicidade, principalmente os microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, têm alta afinidade pela interface hidrocarboneto-água ou ar-água. Nestes casos, a célula microbiana é, por si só, um biossurfactante (DESAI & BANAT, 1997; KARANTH *et al.*, 1999).

2.9. Função fisiológica dos biossurfactantes

Embora a exata função fisiológica dos biossurfactantes ainda não tenha sido completamente elucidada, algumas funções têm sido atribuídas a esses compostos:

- ✓ Emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, facilitando o crescimento de microrganismos nestes substratos (FRANCY *et al.*,

1991; NITSCHKE & PASTORE, 2002). Porém, cepas de *Bacillus subtilis* produzem surfactantes apenas em substratos hidrossolúveis (COOPER *et al.*, 1981);

- ✓ Transporte de hidrocarbonetos: função atribuída aos biossurfactantes ligados à parede celular de *Torulopsis tropicalis*, onde um aumento significativo da porção lipídica do polissacarídeo de membrana foi detectado quando o microrganismo crescia em alcanos, indicando que o complexo polissacarídeo-ácido graxo presente na superfície celular estaria envolvido no transporte de hidrocarbonetos (DESAI & BANAT, 1997; NITSCHKE & PASTORE, 2002);
- ✓ Aderência-liberação da célula a superfícies: uma das mais importantes estratégias de sobrevivência dos microrganismos é sua habilidade em colonizar um nicho ecológico onde possa se multiplicar. O elemento chave nesta estratégia são estruturas da superfície celular responsáveis pela aderência das células às superfícies dos materiais. Os microrganismos podem utilizar surfactantes ligados à parede para regular as propriedades da superfície celular, visando aderir ou se desligar de um determinado local de acordo com sua necessidade para encontrar novos habitats com maior disponibilidade de nutrientes ou se livrar de ambientes desfavoráveis (ROSENBERG & RON, 1999);
- ✓ Atividade antibiótica: demonstrada por vários biossurfactantes, principalmente da classe dos lipopeptídios e glicopeptídios. Os raminolipídeos de *Pseudomonas aeruginosa* e a surfactina de *B. subtilis* podem atuar como antibióticos, solubilizando os principais componentes das membranas celulares microbianas. Através da excreção destes biossurfactantes no meio, os microrganismos adquirem maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes (LIN *et al.*, 1994).

2.10. Propriedades dos biossurfactantes

Os biossurfactantes apresentam características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os torna comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência (REISER *et al.*, 1989). Adicionalmente, por não serem derivados do petróleo, seu preço não depende de fatores político-econômicos. Outra vantagem reside na possibilidade de modificação da estrutura química e das propriedades físicas dos biossurfactantes através de manipulações genéticas, o que permite o desenvolvimento de produtos para aplicações específicas (BANAT, 2000).

Apesar da diversidade de composição química e propriedades, algumas características são comuns à maioria dos biossurfactantes. Muitas destas características representam vantagens sobre os surfactantes convencionais (BOGNOLO, 1999):

- Atividade superficial e interfacial: os biossurfactantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais (detergentes aniônicos sulfatados), pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações de biossurfactante (COOPER & PADDOCK, 1984). A concentração micelar crítica (CMC) dos biossurfactantes (medida de sua eficiência) varia entre 1-2000 mg/L, enquanto que a tensão interfacial (óleo/água) e superficial fica em torno de 1 e 30 mN/m, respectivamente (BOGNOLO, 1999);

- Tolerância à temperatura, pH e força iônica: alguns biossurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica e de pH podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas. O lipopeptídio de *B. licheniformis* JF-2 é estável a temperaturas em torno de 75°C por até 140 h e pH entre 5 e 12 (HOROWITZ *et al.*, 1990). Os biossurfactantes suportam concentrações de 10% de NaCl, enquanto que uma concentração salina de 2-3% é suficiente para inativar surfactantes convencionais (BOGNOLO, 1999);

- Biodegradabilidade: diferentemente dos surfactantes químicos, os biossurfactantes são facilmente degradáveis na água e no solo, o que os torna adequados para aplicações como biorremediação e tratamento de resíduos (MULLIGAN *et al.*, 1993);

- Baixa toxicidade: os biossurfactantes têm recebido maior atenção também devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998). Além disto, sua baixa toxicidade permite o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (FLASZ *et al.*, 1998).

2.11. Produção de biossurfactantes e parâmetros importantes na mesma

As inúmeras vantagens, citadas anteriormente para os biossurfactantes, não são por si só suficientes para validar sua produção industrial. Um dos fatores que, indiscutivelmente, contribui para o interesse na produção de biossurfactantes está relacionado ao fato destes compostos apresentarem variações estruturais, o que lhes

confere grande potencial para aplicações específicas. Até o presente momento, a produção de biossurfactantes não tem interesse comercial devido aos maiores custos do processo em relação aos surfactantes químicos. Entretanto, esses custos poderão ser reduzidos sobremodo, pela utilização de fontes renováveis e de baixo custo, ou ainda melhor, pelo emprego de resíduos industriais. Neste caso, haverá ainda um benefício ao meio ambiente pela redução da carga de material poluente (ALMEIDA, 2002).

De qualquer modo, vale lembrar que antes que os biossurfactantes venham a ser comercializados com sucesso, será necessário maximizar rendimento e produtividade do processo, bem como diminuir os custos relativos à sua recuperação (ALMEIDA, 2002).

Diferentes possibilidades na produção de biossurfactantes (KOSARIC *et al*., 1987):

1. Crescimento celular associado à produção de biossurfactantes:
   1.1. Indução da produção por adição de substratos lipofilicos;
   1.2. Aumento de produção pela otimização da composição do meio;
   1.3. Aumento de produção pela otimização de fatores ambientais como pH, temperatura, aeração, velocidade de agitação, etc.;
   1.4. Aumento de produção pela adição de compostos que ocasionem mudanças na permeabilidade da parede celular, como a penicilina, EDTA, etc.;
   1.5. Aumento de produção pela adição de compostos que ocasionem uma alteração na ligação parede celular-biossurfactante em meios contendo alcanos, querosene, EDTA, etc.
2. Produção de biossurfactantes em condição limitante de crescimento:
   2.1. Produção sob limitação de nitrogênio;
   2.2. Produção sob limitação de cátions multivalentes;
   2.3. Aumento de produção por estresse causado pela variação das condições ambientais, como pH e temperatura.
3. Produção de biossurfactante por células em estarvação:
   3.1. Produção de células livres em estarvação;
   3.2. Produção de células imobilizadas em estarvação;
   3.3. Produção de células imobilizadas em estarvação com adição simultânea de matérias-primas renováveis;
4. Produção de biossurfactantes pelo crescimento de células livres e imobilizadas em estarvação com adição de precursores.

Alguns dos fatores que interferem na produção de biossurfactantes serão descritos a seguir:

Estabelecer um modelo padrão para a produção de biotensoativos é muito difícil, uma vez que estes compostos formam, como anteriormente enfatizado, um grupo estruturalmente bastante heterogêneo, cuja composição depende da cultura microbiana e das condições nutricionais e ambientais empregadas para seu cultivo. Desta forma, o desenvolvimento de um processo fermentativo deve ser otimizado para cada biossurfactante desejado, de acordo com as especificações pretendidas. Como em qualquer outro processo fermentativo, o principal objetivo na produção de biotensoativos é maximizar rendimento e produtividade, isto é, alcançar altas concentrações finais a partir da conversão total do substrato no menor intervalo de tempo (LIN, 1996).

No entanto, a produção de biossurfactantes se depara com várias dificuldades de processo. Entre os parâmetros que influenciam o tipo e a quantidade de produto produzido estão a natureza da fonte de carbono, possíveis limitações nutricionais e parâmetros físicos e químicos, como aeração, agitação, temperatura e pH (FIECHTER, 1992). Porém, um dos maiores empecilhos à produção reside na formação de espuma em decorrência da aeração, mas especialmente pela própria presença do biossurfactante. Isto reflete em operar o biorreator em condições subótimas e na utilização de volumes muito abaixo da sua capacidade nominal, resultando em baixas de produção.

A síntese dos biossurfactantes durante o crescimento celular é freqüentemente relacionada com a diminuição da tensão superficial ou interfacial do meio, e a emulsão de substratos lipofilicos no caldo da cultura (KOSARIC *et al.*, 1987). Alguns microrganismos só produzem compostos tensoativos quando cultivados em hidrocarbonetos. Entretanto, biossurfactantes podem ser produzidos a partir de substratos simples, solúveis em água, como os carboidratos. Tal fato tem grande relevância, considerando que fermentações com carboidratos são mais facilmente conduzidas do que com hidrocarbonetos. A escolha da fonte de carbono deve ser ditada não só pelo seu custo, disponibilidade e pelas características nutricionais do agente fermentativo, como também pelo tipo de aplicação que se deseja do biossurfactante a ser produzido (ALMEIDA, 2002). Logo, a fonte de carbono é um fator importante no processo de síntese, uma vez que a alteração do substrato geralmente resulta em modificação da estrutura química do biossurfactante, ocasionando variação das suas propriedades físico-químicas.

Alguns exemplos são encontrados na literatura, onde diferentes fontes de carbono foram usadas para o crescimento do microrganismo e produção dos compostos tensoativos. Abaixo são descritos alguns dos resultados publicados a fim de realçar a importância da fonte de carbono na produção de biotensoativos, e também demonstrar que a matéria-prima depende diretamente da espécie microbiana, e inclusive da linhagem empregada no processo fermentativo.

Cooper *et al.* (1983), trabalhando com *Bacillus subtilis* ATCC 21332, observaram baixa produção de surfactina quando a bactéria foi cultivada em caldo nutriente. Porém, quando o cultivo foi realizado em meio contendo glicose e sais minerais, foi obtido o valor de concentração micelar crítica relativa (CMC^{-1}) de 20 mM, correspondendo a um rendimento apreciável. O biossurfactante produzido foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio de 62 para 27 mN/m e a tensão interfacial com hexadecano de 22 para 1 mN/m. A adição de hexadecano ao meio de produção favoreceu o crescimento celular, porém inibiu a síntese da surfactina.

Posteriormente, Cooper *et al* (1984) estudaram a produção de biossurfactante por duas espécies de *Bacillus*. O crescimento da linhagem *Bacillus* sp. IAF343 em meio contendo sacarose produziu um lipídeo neutro com alto rendimento e com efetiva propriedade emulsificante, entretanto não houve diminuição significativa da tensão superficial. Em meio de mesma composição, a linhagem *Bacillus cereus* IAF 346 produziu dois agentes tensoativos com propriedades bem diferentes: um polímero contendo glucosamina com capacidade de estabilizar emulsão óleo/água, e uma mistura homóloga de monoglicerídeos saturados que diminuiu a tensão superficial da água de 72 para 28 mN/m.

Do mesmo modo, a adição adequada de compostos lipofílicos, com longas cadeias de ácidos, ésteres, hidrocarbonetos ou glicerídeos, para crescimento de culturas de *Torulopsis (*sinonímia de *Candida) magnoliae* aumentou a produção de glicolipídeos de três a cinco vezes (TULLOCH *et al.*, 1962). De acordo com Cooper & Paddock (1983), a espécie *Torulopsis petrophilum* pode produzir diferentes agentes tensoativos dependendo do substrato utilizado. Em meio de cultura contendo óleo vegetal, a levedura produziu uma quantidade considerável de mistura de glicolipídeos, sem a capacidade de estabilizar emulsões de sistemas aquosos contendo hidrocarbonetos ou óleos vegetais. Contudo, o cultivo de *T. petrophilum* em substratos solúveis resultou na síntese de uma proteína extracelular com potente ação emulsificante. Em outro trabalho, os mesmos autores obtiveram grande quantidade de glicolipídeo a partir do cultivo de

Torulopsis bombicola em meio contendo glicose e óleos vegetais, ao final da fase exponencial de crescimento (COOPER & PADDOCK, 1984). A produção de glicolipídeo por *T. bombicola* foi também estimulada pela adição de óleos vegetais durante o crescimento em meio contendo 100 g/L de glicose, quando foi obtido rendimento de 80% (COOPER *et al*., 1984). Stuwer *et al.* (1987), trabalhando com *T. apicola,* obtiveram rendimento de glicolipídeo de cerca de 90%, utilizando meio contendo glicose e óleos vegetais. No entanto, em estudo desenvolvido por Gobbert *et al.* (1984), não foi evidenciada modificação nem da fração glicídica, nem da fração lipídica do biossurfactante produzido por *T. bombicola* pela alteração da fonte de carbono. Contudo, Hommel (1990), trabalhando com *Torulopsis apicola* 43747, mais uma vez indica ser a produção de biossurfactante dependente de compostos hidrofóbicos.

Posteriormente, Davila *et al.* (1992) obtiveram altas concentrações de soforoselipídeo e meio constituído de glicose e óleo de semente de bagaço de uva. Nesta condição, forma-se uma camada lipídica sobre a fase aquosa, que pode ser facilmente separada por centrifugação, apresentando a vantagem de impedir a inibição de microrganismos pelo acúmulo de produto. Este mesmo autor mostrou a possibilidade de realizar a fermentação com a linhagem de *T. bombicola* CBS6009, por processo conduzido em batelada alimentada.

Kitamoto *et al.* (1993) obtiveram 40 g/L de biossurfactante quando células de *Torulopsis antartica* T-34 foram cultivadas em meio contendo somente fontes de carbono insolúveis em água. O produto obtido, constituído de lipídeos, manose e eritrol, foi capaz de reduzir as tensões superficial e interfacial em n-tetradecano, para cerca de 28 e 2 mN/m, respectivamente.

Zhou & Kosaric (1995), utilizando como fonte de carbono óleo de canola e lactose, presente no soro do processamento de queijo, para a produção de biotensoativos com *Candida bombicola*, obtiveram rendimentos de 90-110 g/L. Os autores determinaram, ainda, uma diminuição da tensão superficial (interface ar/água) de 72 para 33 mN/m e da tensão interfacial (interface óleo/água) de 40 para 1 mN/m.

Lee & Kim (1993) observaram que em batelada simples, 37% da fonte de carbono foram direcionados para a produção de 80 g/L de soforoselipídeo por *T. bombicola*. Entretanto, em batelada alimentada, cerca de 60% do carbono foi convertido em biossurfactante, aumentando a produção para 120 g/L.

Rufino *et al.* (2005) avaliaram a produção de biossurfactantes por *Candida lipolytica* em meio formulado com resíduo do refino de óleos vegetais, suplementado com ácido glutâmico. A tensão superficial do meio fermentado livre de células foi determinada após 72 h de cultivo, observando-se uma redução máxima na tensão do meio de 50 mN/m para 26 mN/m. O índice de emulsificação do óleo de motor em água pelo bioproduto obtido foi de 79%, enquanto não houve qualquer emulsificação de óleo de milho e de n-hexadecano. Outro estudo realizado por De Luna *et al*. (2005) evidenciou redução da tensão superficial do meio de produção de 56 mN/m para 31 mN/m decorridas 96 horas, pelo cultivo de *Candida glabrata* em óleo de algodão e glicose.

De acordo com alguns autores, a fonte de carbono é fundamental na produção de raminolipídeos por diferentes espécies de *Pseudomonas* (YAMAGUCHI, *et al*., 1999; SYLDATK *et al.*, 1985). Fontes de carbono solúveis em meios aquosos como glicerol, glicose, etanol, entre outras, podem ser usadas para a produção de raminolipídeos por *Pseudomonas* sp (REISER *et al*., 1989).

Robert *et al.* (1989), testando diferentes fontes de carbono, observaram a produção de raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 somente na presença de dodecano. O crescimento da bactéria utilizando como substratos succinato, piruvato e citrato levaram à pequena formação de produto, embora este tenha propiciado queda substancial da tensão superficial do caldo fermentado. Os melhores resultados foram obtidos para óleo de oliva como substrato, quando foram obtidos valores de produção de 7,65 g/L, CMC^{-1} de 20 e tensão superficial de 28,4 mN/m.

Segundo Banat *et al*. (1991), a síntese de biossurfactante pela linhagem *Pseudomonas* Pet-1006 é dependente da presença de duas fontes de carbono no meio de produção. Os autores indicam o emprego de glicose como substrato prontamente assimilável e um hidrocarboneto, como o ácido oléico, para ser consumido após o esgotamento da glicose.

Patel & Desai (1997) estudaram a produção de glicolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* utilizando melaço como fonte de carbono. Após 96 horas, o fluido sobrenadante da cultura apresentou uma concentração de raminose de 0,24 g/L e diminuição da tensão interfacial contra óleo bruto de 21 mN/m para 0,47 mN/m. Outro trabalho publicado naquele ano, mostrou a produção de 32 g/L de raminolipídeos pelo cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3924 em meio contendo etanol como única

fonte de carbono, em sistema conduzido por batelada alimentada (MATSFUJI *et al.,* 1997).

As espécies de *Pseudomonas* são conhecidas por sua capacidade de produzir biotensoativos raminolipídicos (BABU *et al*, 1996), os quais não são inativados por condições físico-químicas desfavoráveis, como pH, temperatura e salinidade (BANAT, 1995). De acordo com Mercadé & Manresa (1994), os microrganismos deste grupo são os mais adaptados para o crescimento e produção de biotensoativos em substratos complexos, como os resíduos industriais. Variadas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* foram capazes de produzir quantidades satisfatórias de glicolipídeos quando cultivadas em hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, como o naftaleno. A produção do tensoativo foi acompanhada pelo aumento da concentração do naftaleno na fase aquosa, indicando que o microrganismo estava promovendo a solubilidade de seu substrato (DÉZIEL *et al.*, 1996).

A produção de raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* UI29791 foi examinada por Linhardt *et al.* (1989). Foi utilizado meio de cultura contendo óleo de milho, como fonte de carbono. Na presença de óleo de milho foram alcançados aumentos significativos nos níveis de massa celular e raminolipídeos, 5,2 g/L e 5,4 g/L respectivamente. A concentração de óleo de milho utilizada foi de 40 g/L. Outro trabalho realizado com óleos vegetais (oliva, soja e girassol), na concentração de 20 g/L, demonstrou que o caldo após fermentação de *Pseudomonas aeruginosa* 42 A2 atingia valores de tensão superficial de 32,0, 34,0 e 35,5 mN/m, respectivamente (ANDRÉS *et al.*, 1994).

Haba *et al.* (2000) determinaram a produção de biotensoativos por *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 em óleo usado para a fritura de alimentos. A produção de raminolipídeos obtida, expressa em concentração de raminose, foi de 2,7 g/L.

Wongsa *et al.* (2004), isolaram e identificaram duas novas linhagens WatG (*Pseudomonas aeruginosa*) e HokM (*Serratia marcescens* sp.), as quais demonstraram possuir alta capacidade de degradação de hidrocarbonetos (gasolina, querosene, diesel, e óleo lubrificante). Cerca de 90-95% do óleo diesel e do querosene foram degradados pela WatG entre 2 a 3 semanas. A degradação do óleo lubrificante ficou entorno de 60% em 2 semanas. A capacidade degradativa da linhagem HokM para a querosene, óleo diesel e lubrificante foi de 50 a 60%.

Yu-Hong Wei *et al*. (2005), utilizando linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de águas residuárias de uma fábrica petroquímica, testaram a produção de

raminolipídeos a partir de uma grande variedade de fontes de carbono (glicose, glicerol, óleo diesel, querosene, e óleos de oliva, de girassol, e de semente de uva). Altos teores de raminolipídeos (1400-2100 mg/L) foram obtidos usando glicerol, glicose, óleos de girassol e de semente de uva, como substratos. Porém, a maior concentração de raminolipídeos (3600 mg/L) foi obtida pelo emprego de óleo de oliva, com redução da tensão superficial da água para 31 mN/m.

Monteiro *et al*. (2005), utilizando a linhagem *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614, isolada de poços de petróleo, apresentou melhores resultados em fermentação submersa quando a tensão superficial do sobrenadante do meio de cultivo atingiu 27 mN/m (tensão superficial do meio inicial 45,67 mN/m). Ensaios prévios por cromatografia em camada delgada (CCD) mostraram que o biossurfactante tratava-se de um raminolipídeo, cuja produção máxima utilizando-se glicerol como fonte de carbono foi de 3,9 g/L, no 8º dia de fermentação.

Siddhartha *et al.* (2006) avaliaram a produção de raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* LBI a partir de diferentes óleos vegetais (buriti, cupuaçu, andiroba, babaçu e noz brasileira). A maior concentração de biossurfactante, de 9,9 g/L, foi obtida pelo emprego do óleo de noz brasileira.

O estudo comparativo da produção de raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* UW-1 a partir de glicose, etanol, glicerol e diferentes óleos vegetais, na concentração de 6% (v/v), definiu o óleo de canola, seguido pelo óleo de soja, como melhores fontes de carbono, quando foram obtidos máximos de 23,9 e 22,4 g/L de raminolipídeos , respectivamente, no mesmo tempo de cultivo (13 dias). O uso dos óleos de oliva ou de milho também favoreceu a conversão, apesar dos rendimentos terem sido inferiores comparativamente aos óleos de soja e canola. Contudo, a produção foi irrisória nos meios preparados com glicose, etanol e glicerol (SIM *et al.,* 1997).

Apesar da estrutura e dos rendimentos dos biotensoativos dependerem criticamente da fonte de carbono e das espécies microbianas utilizadas, outros fatores nutricionais podem afetar sua produção, como as fontes de nitrogênio e de fosfato, a presença de íons metálicos e outros aditivos, não só quali mais quantitativamente.

Estudo realizado com *Acinetobacter paraffineus* ATCC19558 demonstrou que a natureza da fonte de nitrogênio tem ação efetiva na produção de biossurfactante (DUVNJAK *et al.*, 1983). Neste trabalho foi avaliada a influência de substâncias nitrogenadas, orgânicas e inorgânicas, como íons amônio e nitrato, uréia, extrato de lêvedo e diferentes aminoácidos, tais como asparagina, ácido aspártico e ácido

glutâmico. Quando os sais inorgânicos foram utilizados como fonte de nitrogênio, houve utilização preferencial dos sais amoniacais. A suplementação do meio mineral exclusivamente com asparagina foi suficiente para o cultivo da linhagem em estudo, porém, a adição de extrato de lêvedo proporcionou uma produção de surfactante 6 vezes maior.

Singer (1990) observou que *Rhodococcus* sp. H13-A, cultivado em hexadecano, produziu maiores quantidades de glicolipídeo quando a relação C/N (hexadecano/nitrato de sódio) aumentou de 1,7 para 3,4.

Espuny *et al.* (1996) trabalhando com *Rhodococcus* S1T7, verificaram que dentre as concentrações de nitrato de sódio testadas, de 2 a 7 g/L, valor máximo de glicolipídeo foi obtido para 2,5 g/L do composto. Quando sulfato de amônio foi empregado como fonte de nitrogênio, os autores observaram inibição do crescimento celular após 48 h de cultivo, provavelmente em conseqüência da diminuição do pH do meio de cultura.

De Roubien *et al*. (1989), estudando o efeito da fonte de nitrogênio na produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332, verificaram que o meio de cultura constituído de 40 g/L de glicose e 4 g/L de nitrato de amônio foi o mais apropriado tanto para o crescimento celular quanto para produção de biossurfactante. A adição de aminoácidos constituintes da seqüência do peptídeo, como os ácidos aspártico e glutâmico, não teve qualquer efeito, enquanto a presença de glutamina ocasionou inibição total da produção de surfactina.

Makkar & Cameotra (1997), trabalhando com uma linhagem de *Bacillus subtilis,* obtiveram máximo de produção de lipopeptídeo, após cultivo a 45°C por 72 h, quando uréia ou nitrato foi utilizado como fonte de nitrogênio, na concentração de 3 g/L. Por outro lado, Palejwala & Desai (1989), trabalhando com uma bactéria Gram-negativa, verificaram que a produção de biossurfactante não foi influenciada pela concentração de sulfato de amônio, nitrato de amônio ou uréia, mas sim pela concentração de fosfato.

Syldatk & Wagner (1987) relataram que a produção de raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* cultivada em glicose como fonte de carbono aumentou de 7 a 10 vezes após a limitação de NO_3^-.

Em experimentos realizados com *Pseudomonas* UI29791, LINHARDT *et al* (1989) observaram que meios contendo baixos níveis de nitrogênio, adicionados na forma de nitrato de sódio, 1,5 a 2,0 g/L, resultaram em aumento da produção de raminolipídeos. Por outro lado, ao estudar o efeito de diferentes fontes de nitrogênio

com relações C/N variando de 15 a 76 na produção de glicolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6, Ramana *et al.* (1989) verificaram que relações C/N baixas suportam bom crescimento microbiano, mas produzem uma quantidade de biotensoativos pequena, enquanto que a relação C/N de 38 mostrou-se ótima para a produção destes compostos. Trabalhando com a mesma espécie, os autores (RAMANA *et al.,* (1989 b) demonstraram que a produção de glicolipídeos coincidiu com a exaustão do nitrogênio (16 horas) e sua concentração aumentou linearmente com o tempo, atingindo o nível máximo de 0,4 g/L do tensoativo, em 96 horas. Após este período houve uma pequena diminuição no nível de glicolipídeo até 148 horas, quando a fermentação parou.

Robert *et al.* (1989) estudaram o efeito de diferentes fontes de nitrogênio, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3, NH_4Cl e $NaNO_3$, em concentrações de 2 a 5 g/L, na produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. Uma redução apreciável de tensão superficial do meio, que atingiu valor mínimo de 26 mN/m, só foi observada pela adição de 2 ou 3 g/L de $NaNO_3$.

De acordo com Oshner *et al.* (1996), *Pseudomonas aeruginosa* PG201 é capaz de utilizar tanto amônia como nitrato, como fontes de nitrogênio, embora tenha sido observada uma produção de biossurfactante mais elevada quando se utilizou nitrato. Os autores afirmam que um aumento significativo na síntese de raminolipídeos resulta da limitação de nitrogênio e que relações C/N entre 15 e 23 são ideais para obtenção de altas produtividades.

O estudo da produção de raminolipídeo por *Pseudomonas aeruginosa* GS3 utilizando 1 a 20 g/L de água de milho como fonte de nitrogênio, revelou uma concentração máxima para o biossurfactante de 5 g/L (PATEL & DESAI, 1997). Os autores também observaram que quantidades crescentes da fonte de nitrogênio resultaram em menores quantidades de raminolipídeo, cerca de 2 a 3 g/L, determinando a necessidade de estabelecer uma relação carbono/nitrogênio ótima para maximizar a síntese de biossurfactante.

Mais recentemente, a publicação de Fernandes *et al.* (2005) demonstrou o efeito da concentração de nitrogênio na produção de biossurfactante ramnolipídico por *Pseudomonas aeruginosa* LBI, quando cultivada em resíduos do refino de óleos vegetais. Os estudos realizados em mesa agitadora com temperatura controlada indicaram ser a concentração de $NaNO_3$ de 4 g/L a mais adequada para o bioprocesso, proporcionando 7,3 g/L de raminolipídeos após 72 horas.

Durante os estudos sobre a produção de raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* 47T2, cultivadas em óleo de fritura, Haba *et al.* (2000) verificaram que além da concentração de biomassa, diferentes concentrações de nitrato afetaram o perfil de produção e o rendimento de biotensoativos. A produção foi maior quando o conteúdo de nitrato adicionado foi de 3 g/L, quando comparada com a obtida com concentrações de 4, 5, e 7 g/L. Além do nitrogênio, as concentrações de outros nutrientes merecem atenção na produção de biotensoativos (LIN, 1996).

Guerra-Santos *et al.* (1984), ao cultivarem *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2659 em meio contendo glicose, como fonte de carbono, verificaram que a produção máxima de raminolipídeos, expressa em concentração de raminose (0,6 g/L) foi obtida com a adição de sulfato de magnésio ao meio à concentração de 0,2 g/L. Com o aumento da quantidade de magnésio adicionada, a concentração de biossurfactante diminuiu. Ao estudarem a influência de outros elementos, como K, Na e Ca, na produção de raminolipídeos, verificaram que a concentração final do biotensoativo não foi afetada quando a quantidade adicionada destes nutrientes foi diminuída pela metade. No mesmo trabalho foi sugerido que é necessária uma concentração mínima de ferro e uma relação deste com fosfato abaixo de 16 para obter produção máxima de raminolipídeos.

Estudos realizados por Robert *et al.* (1991), para as concentrações de K_2HPO_4 e KH_2PO_4 de 0,5 a 1,0 g/L e de 1,0 a 2,0 g/L, respectivamente, apresentaram crescimento ótimo de *Pseudomonas aeruginosa* 44T1, assim como produção ótima de biotensoativos. Entretanto, concentrações superiores resultaram em inibição do crescimento e em menor acúmulo de tensoativos. O emprego dos dois sais em conjunto é necessário, posto que K_2HPO_4 estimula o crescimento bacteriano enquanto K_2HPO_4 favorece a produção. Ao estudar a influência da concentração inicial de magnésio, adicionado na forma de $MgSO_4.7H_2O$, os autores verificaram que concentrações deste sal inferiores a 0,5 g/L resultam em menor crescimento bacteriano e em inibição total no acúmulo de tensoativos. O mesmo foi observado quando se suprimiu do meio o sal contendo ferro na forma de $FeSO_4$. A máxima produção de raminolipídeos foi observada na concentração de ferro de 0,001 g/L.

A composição de nutrientes no meio de cultura influencia a produção de surfactina por *Bacillus subtilis*. A adição de ferro ou sais de magnésio no caldo nutriente melhora a produção do lipopeptídeo (COOPER *et al.*, 1981).

Lin *et al.* (1994), estudando o efeito da concentração de NaCl no meio de produção por *B. subtilis* JF2, observaram que não houve diferença na síntese de

biossurfactante nas concentrações estudadas de 5 a 20 g/L. Estudo semelhante foi realizado com outra linhagem de *B. subtilis*, utilizando concentrações de NaCl de 0,1 a 40 g/L. Esta bactéria foi capaz de crescer e produzir biossurfactante, reduzindo a tensão superficial do meio de 68 para 28 mN/m em todas as concentrações de NaCl testadas. Entretanto, houve decréscimo na sua produção quando foi utilizado 40 g/L (MAKKAR & CAMEOTRA, 1997).

No caso de *Nocardia erythropolis*, a produção de surfactante foi maximizada pela adição de 0,02% de extrato de levedura (MARGARITIS *et al.*, 1979).Da mesma forma, o extrato de levedura teve influência positiva na produção de surfactante por *Arthrobacter paraffines,* bem como a peptona, bactotriptona e o caldo nutriente. A concentração ótima destes compostos está em torno de 0,2, 0,8 e 0,4%, respectivamente. No entanto, concentrações maiores destes compostos causaram um decréscimo na produção de surfactante (LANG *et al.*, 1998).

Ristau &Wagner (1983) demonstraram aumento na produção de biossurfactante por *Rhodococcus erythropolis* pela incorporação de EDTA ao meio. Já Espuny *et al.* (1996), cultivando *Rhodococcus* S1T7 para produção de glicolipídeos, determinaram ser benéfica a adição dos íons fosfato e ferro, nas concentrações de 1,5 a 2,5 g/L e 0,01 g/L, respectivamente.

Além das fontes de carbono, nitrogênio e a composição do meio, as condições ambientais são variáveis importantes uma vez que podem influenciar tanto o crescimento celular quanto a produção de surfactante. As condições de cultivo, tais como temperatura, pH e tensão de oxigênio, interferem nas velocidades das reações enzimáticas, ou seja, estão diretamente relacionadas à atividade metabólica dos microrganismos e, portanto, também podem influenciar acentuadamente a produção de biossurfactantes (DESAI & BANAT, 1997).

O valor do pH, entre 6,5 a 7,0 no meio de cultivo, desempenha um importante papel na produção de raminolipídeos por *Pseudomonas* sp (DUVNJAK *et al.*, 1985). Persson *et al*. (1988) obtiveram maiores rendimentos de raminolipídeo, cerca de 378 mg/L, pelo cultivo de *Pseudomonas fluorescens* em pH 8,0. Posteriormente, trabalho realizado com *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 determinou como ótima a faixa de pH entre 5,5 e 7,5 para produção deste biossurfactante (ROBERT *et al*., 1989).

Em pH acima de 6,5, a formação de espuma é bem mais intensa do que a valores mais baixos (GUERRA-SANTOS *et al*., 1986). Segundo Wu & Ju (1998), a propriedade tensoativa dos raminolipídeos causa a formação de espuma durante o

processo de fermentação aerada, sendo este problema especialmente agravado em pH acima de 6,8. Por outro lado, após realizarem diversos testes fermentativos com *Pseudomonas aeruginosa* cultivada em n-hexadecano, controlando o pH em 6,5 ± 1, estes autores observaram que a síntese de raminolipídeos foi extremamente baixa.

De Roubin *et al.* (1989) observaram que um aumento no valor de pH, de 6,7 para 8,0, no meio de produção resultou na diminuição da síntese de surfactina por *Bacillus subtilis*. Em outro trabalho, também realizado com *B. subtilis*, foram obtidos valores máximos e constantes de biomassa (2,19 g/L) e de biossurfactante (0,840 g/L) na faixa de pH de 6,5 a 10,5. Entretanto, estes valores sofreram decréscimos expressivos quando o pH do meio de cultivo foi ajustado em 4,5 (0,2 g/L biomassa e 0,108 g/L de biossurfactante) (MAKKAR & CAMEOTRA, 1997).

Kitamoto *et al.* (1993) estudaram o efeito do pH, pela utilização de tampões fosfato, na produção de uma mistura de manosilerytriotol lipídeos por *Torulopsis antartica* T-34, obtendo baixos rendimentos em todos os valores de pH testados. Conforme citação dos autores, esses resultados provavelmente foram resultantes da inibição da levedura pelo fosfato. Neste trabalho, também foi determinada a temperatura ótima de 25°C para síntese deste biossurfactante pelo microrganismo em estudo.

A temperatura também teve grande importância no cultivo de *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558 (DUVNJAK *et al.*, 1983), *Rhodococcus erythropolis* (SYLDATK *et al.*, 1985) e *Pseudomonas* sp DSM 2874 (SYLDATK *et al.*, 1987). Em todos os casos a produção do biossurfactante era dependente da temperatura.

Ohno *et al*. (1995), avaliando a produção de surfactina por uma linhagem recombinante de *Bacillus subtilis* MI113, em diferentes temperaturas, de 20 a 50°C, obtiveram máximo de produção a 37°C. Temperaturas acima ou abaixo deste valor resultaram em diminuição do rendimento de biossurfactante. Comportamento semelhante foi observado por Duvnjak *et al.* (1982), para *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558, que apresentou maior produção de surfactante a 27°C.

Guerra-Santos *et al.* (1986) realizaram estudos de produção de biotensoativos por *Pseudomonas aeruginosa*, sob temperaturas variando de 28 °C a 39 °C, verificando que a temperatura ótima para a produção destes compostos está entre 31°C e 34°C. O crescimento bacteriano e a produção de biotensoativos não ocorreram a temperaturas abaixo de 28°C ou superiores à 39°C. Ao aumentarem a temperatura de 28°C para 39°C, obtiveram decréscimo no rendimento da biomassa de 0,17 para 0,12 g/L. Por

outro lado, segundo Robert *et al.* (1991), a temperatura máxima de acúmulo de tensoativos é independente da temperatura ótima de crescimento do microrganismo. Conforme os autores, a temperatura sob a qual a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* produz maior concentração de raminolipídeos é de 37°C, ao passo que sua temperatura ótima de crescimento se situa ao redor de 27°C. Ainda, o crescimento bacteriano diminui ligeiramente à temperatura de incubação de 30ºC, ocorrendo um decréscimo maior à 37°C.

No que tange a velocidade de agitação, a produção do biossurfactante depende do tipo de reator e do microrganismo usado.

Yu-Hong *et al.* (2005), estudaram o efeito de direfentes taxas de agitações (50 a 250 rpm) na produção de raminolipídeos utilizando *Pseudomonas aeruginosa* J4, isolada de água residuárias de indústria petroquímica, e descobriram que a agitação de 200 rpm foi favorável à produção de raminolipídeos, aumentando-a em cerca de 80%.

O aumento da agitação de 250 para 500 rpm resultou em decréscimo da produção de biossurfactante por *Nocardia erythropolis*, assim como no crescimento deste microrganismo (MARGARITIS *et al*., 1979).

Javaheri *et al*. (1985) demonstraram que *Bacillus licheniformis* JF2 produz biossurfactante aniônico, tanto em condição de aerobiose quanto de anaerobiose, diminuindo a tensão superficial do meio de 70 para 28 mN/m. Por outro lado, Lin *et al*. (1994) mostraram que a síntese do lipopeptídeo JF2 é afetada pela concentração de O_2 dissolvido, sendo altamente inibido por teores de O_2 dissolvido de 80%.

O crescimento microbiano e a produção de biossurfactantes estão intimamente relacionados à transferência de oxigênio no meio de cultivo. Andrés *et al.* (1994) estudaram diferentes graus de aeração e agitação durante a formação de ácido 7,10-dihidroxi-8-decanóico por *Pseudomonas* sp 42A2, cultivada em ácido oléico. Os autores verificaram que baixos valores de K_La, coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, afetaram negativamente a transformação do ácido oléico, indicando que o oxigênio é um fator determinante. A produção cresceu significativamente com o aumento do coeficiente K_La para níveis superiores a 400. Valores mais altos de K_La, entretanto, levaram à menor produção.

A produção de biotensoativos, visando um processo em larga escala, vem sendo realizada em biorreatores operando em sistemas de batelada convencional, batelada alimentada, semicontínuo e com recirculação de células (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998).

Durante a produção em mesas agitadoras, alguns parâmetros como a taxa de transferência de oxigênio e o pH dificilmente podem ser monitorados. Quando se realiza a fermentação em biorreatores a possibilidade de monitorar estes parâmetros contribui para a otimização do processo. Apesar destes pontos positivos, a produção em larga escala apresenta sérios problemas de processo, devido principalmente, à intensa formação de espuma. Este é um dos fatores que limita a produção industrial de biossurfactantes.

Segundo Guerra-Santos *et al.* (1986), o cultivo de microrganismos produtores de tensoativos resulta numa grande formação de espuma, o que leva a problemas operacionais, como transbordamento e o arraste de células e de produto.

Os riscos de formação de espuma podem ser minimizados pelo uso de um sistema de controle de espuma, o qual pode ser mecânico ou, mais comumente utilizado, um sistema envolvendo a adição de um agente químico antiespumante, como por exemplo, um composto com base em silicone ou propileno glicol (IRVINE, 1990). Contudo, no caso de produção de biossurfactantes, a utilização de agentes antiespumantes durante a produção de surfactantes é inadequada (FIECHTER, 1992). Mas, segundo Linhardt *et al.* (1989), não houve diminuição na formação de raminolipídeos ou de biomassa pelo uso do antiespumante B (Sigma) ao cultivarem *Pseudomonas* sp UI29791, em fermentadores.

Para evitar a formação de espuma durante a fermentação de *Pseudomonas fluorescens* para produção de biotensoativos, Persson & Molin (1987) trabalharam com um volume de meio de cultivo de 2,1 L em um biorreator, com capacidade de 7 L e removeram as chicanas do equipamento. Neste experimento, a agitação aplicada foi de 1000 rpm e a aeração de 0,5 vvm. Do mesmo modo, Lang & Wagner (1987) tentando evitar o arraste celular pela intensa formação de espuma durante a produção de raminolipídeos, desenvolveram um sistema utilizando células imobilizadas em reator operando em sistema contínuo. Com isso, as células podem ser facilmente retidas no seio do meio.

Durante a produção de raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*, em meio contendo n-hexadecano, foi observada intensa formação de espuma, particularmente em valores de pH acima de 6,8 (WU e JU, 1998). No entanto, em pH 6,5 ± 0,1, a produção de raminolipídeos foi baixa, com formação de grande quantidade de ácidos graxos.

De acordo com Kosaric *et al.* (1983), alguns biossurfactantes podem estabilizar uma superfície em expansão durante a formação de espuma (interface ar/água) ou

durante a emulsificação (interface água/composto orgânico). Assim, a coleta de espuma e emulsão de culturas produtoras de biossurfactantes seria um método adequado para a recuperação de alguns compostos tensoativos.

Mercadé *et al.* (1993) utilizaram a formação de espuma de forma favorável na recuperação de raminolipídeos. Após o cultivo de *Pseudomonas* sp em água residuária do refino de óleo de oliva, o mosto livre de células, apresentando 1,4 g/L de raminolipídeos, foi armazenado em um tanque no qual foi insuflado ar. A espuma formada foi coletada em outro tanque, onde se liquefez. Deste modo, obtiveram um produto com 6,4 g/L de raminolipídeos.

Em alguns casos, a produção de biossurfactante não está associada ao crescimento celular, apenas ocorrendo em condições limitantes do crescimento. De modo que, a máxima produção de raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* ocorre apenas após a fase exponencial de crescimento. Como exemplo, tem-se a limitação de nitrogênio ou de cátions multivalentes (HAUSER & KARNOVSKY, 1957).

Syldatk & Wagner (1987) relatam que a produção de raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em glicose, aumentou de 7 a 10 vezes com a limitação de NO_3^-. A limitação de Fe^{2+}, Mg^{2+} ou Ca^{2+}, os quais são essenciais para o crescimento desta espécie, também favoreceu a produção de raminolipídeos.

Outro trabalho demonstrou que a limitação de íons NH_4^+ ou NO_3^- induz a máxima produção de raminolipídeos por *Pseudomonas* sp DSM 2874 em n-alcanos (SILDATK *et al.*, 1987). Similarmente, a produção de raminolipídeos por linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* em cultivo contínuo, a partir de glicose como fonte de carbono, resultou em aumento de 7 para 10 g/L, depois da limitação do NO_3^- (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984).

A produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* 378 só teve inicio quando as concentrações de nitrogênio e oxigênio atingiram valores muito baixos (PERSSON *et al.*, 1988). Outros autores também demonstraram que a produção de biossurfactante por *Pseudomonas* sp só era significativa quando a cultura atingia a fase estacionária de crescimento, possivelmente devido às condições limitantes de nitrogênio e ferro (MULLIGAN *et al.*, 1989; RAHMAN *et al.*, 2000).

A limitação dos cátions Fe^{+2}, Mg^{+2} e Ca^{+2}, essenciais para o crescimento de *Pseudomonas*, ocasionou um aumento de cerca de 25% na produção de raminolipídeo (SYLDATK *et al.*, 1985).

Outros autores registraram efeitos similares na produção de agentes tensoativos por outros microrganismos em condições limitantes de nitrogênio. Por exemplo, Gobbert *et al.* (1984) observaram que células de *T. bombicola* produziam soforoselipídeos em condição limitante de nitrogênio. Do mesmo modo, Davila *et al*. (1992), cultivando *T. bombicola* CBS em meio contendo como fontes de carbono glicose e etiléster, verificaram que a produção de soforoselipídeo iniciou após o nitrogênio do meio de cultura ter sido incorporado em proteína celular, ou seja, totalmente consumido.

Mulligan *et al*., (1989) concluiu, através de seus estudos, que a limitação dos cátions multivalentes poderia ser estabelecida pela adição de EDTA em caldo nutriente utilizando a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Neste caso, foi verificado um aumento na produção de biossurfactante em presença de nitrogênio limitante. Esses resultados indicam que o efeito limitante de nitrogênio ou de cátions não é específico, bem como pode estar relacionada à mudança no estado fisiológico do microrganismo produtor do biossurfactante.

2.12. Recuperação de biotensoativos

A recuperação e concentração dos biotensoativos a partir do meio de fermentação são responsáveis pela ampla fração do custo total de sua produção. A baixa concentração destes produtos no meio de cultivo e, ainda, o caráter anfifílico destes compostos podem ser empecilhos para uma eficiente separação. Mas, segundo Lin (1996), a maioria das aplicações não requer biossurfactantes com alto grau de pureza final. Em alguns casos pode ser usado diretamente o meio fermentado, sendo necessário apenas realizar a inativação dos microrganismos nele presentes. De fato, na maioria das vezes, o que importa é que o produto a ser usado apresente as propriedades tensoativas desejadas.

A recuperação dos biotensoativos depende principalmente de sua carga iônica, solubilidade em água e localização (extracelular ou intracelular) (DESAI & BANAT, 1997). Como os tensoativos, em sua maioria, apresentam caráter lipofílico, podem ser isolados por métodos clássicos de extração, precipitação ou cristalização (SYLDATK & WAGNER, 1987).

Em alguns casos, glicolipídeos, incluindo os raminolipídeos podem ser obtidos através da acidificação do meio fermentado, livre de células, com ácido clorídrico ou

sulfúrico até pH 2,0-3,0, seguida de refrigeração, normalmente por um período de 12 h. Os glicolipídeos são isolados na forma de precipitados ou cristais, podendo ser removidos por centrifugação (SILDATK & WAGNER, 1987).

Parra *et al.* (1989) recuperaram os biotensoativos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 através da secagem a frio do caldo de cultura, livre de células, seguido de acidificação e extração com CHCl3:MeOH, na razão de 2:1. Após recuperação, o produto apresentou boas propriedades tensoativas.

Para extrair glicolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, Robert *et al.* (1989) promoveram a acidificação até pH 2 do meio, isento de células e, em seguida, realizaram três extrações consecutivas com clorofórmio e metanol (2:1). O solvente foi removido por evaporação a vácuo e o resíduo analisado por cromatografia de camada delgada em sílicagel 60 G. De forma semelhante, Rocha *et al.* (1992) também utilizaram clorofórmio e metanol na extração do surfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa,* na proporção de 2:1:3 em relação ao meio fermentado.

Extração líquido-líquido também foi adotada por Babu *et al.* (1996), com algumas modificações. O caldo de cultura isento de células teve seu pH ajustado para 2 e foi mantido a 4°C durante a noite e então extraído três vezes com dietiléter resfriado. O solvente foi evaporado a vácuo e o produto foi identificado como sendo um raminolipídeo, através do método do ácido fenolsulfúrico descrito por Dubois *et al.* (1956).

A habilidade das moléculas tensoativas de formar micelas acima da concentração micelar crítica, em alguns casos, permite que estes agregados sejam retidos por membranas de ultrafiltração para separação de produtos com peso molecular relativamente alto. Desta forma, impurezas de peso molecular baixo, como sais, aminoácidos livres, peptídeos e pequenas proteínas, podem ser facilmente removidas. Testando várias membranas de ultrafiltração para retenção de raminolipídeos, Mulligan & Gibbs (1990) concluíram que a membrana YM 10 é a mais apropriada para a separação deste glicolipídeo. Os autores observaram, ainda, que a ultrafiltração pode exercer um importante papel na purificação de biotensoativos, uma vez que grandes volumes de meio podem ser processados rapidamente, a custo extremamente baixo.

Métodos de recuperação de biotensoativos durante o processo fermentativo, ou seja, enquanto vão sendo produzidos, têm se mostrado promissora por apresentar uma série de vantagens, tais como evitar a inibição do microrganismo formado, reduzir os

custos com solventes para posterior extração e gerar águas residuárias com menor carga orgânica.

Syldatk & Wagner (1987) citam um método de produção contínua de raminolipídeos por células imobilizadas de *Pseudomonas* sp DSM 2874 em reator de leito fluidizado, com recuperação simultânea do produto, pela adsorção em resina de poliestireno Amberlita XAD-2. Segundo os autores, pelos procedimento foi possível evitar problemas com a formação de espuma durante o cultivo.

Apesar das vantagens sobre os tensoativos químicos, a utilização dos biotensoativos tem sido restringida pelo custo de sua produção. As preocupações com o meio ambiente relacionado aos tensoativos sintéticos, entretanto, tem começado a pesar no balanço econômico e global em favor dos compostos produzidos biologicamente. Além disso, a diversidade química dos biotensoativos resulta em ampla variedade de propriedades físico-químicas, sendo alguns compostos particularmente adequados para funções específicas. Sendo assim, há muitas áreas de aplicação industrial nas quais os tensoativos sintéticos poderiam ser substituídos pelos biotensoativos. Os surfactantes são uma importante classe de produtos utilizados em todos os setores da indústria na atualidade. Os campos de aplicação podem ser tão diversos quanto agricultura, construção, indústrias de alimentos e bebidas, indústrias de limpeza, de couro, de papel e de metal, têxtil, farmacêutica e petroquímica, entre outras (FIECHTER, 1992).

O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes. Outras aplicações incluem biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a recuperação melhorada de petróleo. Porém, atualmente, as aplicações se distribuem entre os mais diversos setores industriais (NISCHKE & PASTORE, 2002).

2.13. Aplicações industriais e tecnológicas dos biossurfactantes

Apesar das vantagens sobre os tensoativos químicos, a utilização dos biotensoativos tem sido restringida pelo custo de sua produção. As preocupações com o meio ambiente relacionado aos tensoativos sintéticos, entretanto, tem começado a pesar no balanço econômico e global em favor dos compostos produzidos biologicamente. Além disso, a diversidade química dos biotensoativos resulta em ampla variedade de

propriedades físico-químicas, sendo alguns compostos particularmente adequados para funções específicas.

Sendo assim, há muitas áreas de aplicação industrial nas quais os tensoativos sintéticos poderiam ser substituídos pelos biotensoativos. Os campos de aplicação podem ser tão diversos quanto agricultura, construção, indústrias de alimentos e bebidas, indústrias de limpeza, de couro, de papel e de metal, têxtil, farmacêutica e petroquímica entre outras (FIECHTER, 1992).

2.14. Planejamento de experimentos e otimização de processos

O planejamento experimental, baseado nos fundamentos estatísticos é sem dúvida alguma, uma ferramenta pederosa para se chegar às condições otimizadas de um processo, desenvolvimento da formulação de produtos dentro as especificações desejadas ou simplesmente para avaliar os efeitos ou impactos que os fatores têm nas respostas desejadas (RODRIGUES, 2005).

Para a realização de experimentos significativos e confiáveis, deve-se utilizar um método científico de planejamento. Além disso, quando o problema envolve dados que podem conter erros experimentais, um modo adequado de análise é por métodos estatísticos. Em qualquer análise experimental devem-se seguir duas etapas: o planejamento experimental e a análise estatística dos dados, esta última dependente do tipo de planejamento realizado (OLIVEIRA, 2004).

As vantagens do uso do planejamento experimental são (RODRIGUES, 2005):

- Redução do número de experimentos ou repetições e melhora a qualidade da informação obtida pelos resultados. Isto significa uma sensível diminuição do trabalho e, conseqüentemente, do tempo e do custo final;
- Os fatores são analisados simultaneamente. Assim, pode-se verificar e quantificar efeitos sinérgicos e antagônicos entre os fatores de interesse;
- É possível otimizar mais de uma resposta ao mesmo tempo. Pode-se maximizar variáveis como rendimento, produtividade e pureza, e/ou minimizar as variáveis custo e contaminação, entre outras, individual ou simultânea;
- Permite calcular e avaliar o erro experimental. Isto é fundamental para que se possa especificar o nível de confiança estatística o qual pode-se estimar a reprodutibilidade do resultado desejado;
- Não requer conhecimentos elevados em estatística.

A metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfícies de respostas, é uma ferramenta fundamental na teoria estatística, pois permite verificar os efeitos individuais, as interações entre as variáveis, a avaliação dos erros experimentais e de regressão e o equacionamento empírico dos resultados em função das variáveis escolhidas, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa erro (BOX *et al*, 1978).

O processo da síntese de biossurfactante envolve diversas variáveis, assim a análise e planejamento dos experimentos são mais confiáveis utilizando técnicas estatísticas para esse fim. A técnica de superfície de resposta, que tem como base o planejamento fatorial dos experimentos, é de fundamental importância neste trabalho.

O número de variáveis a serem estudados aliados à necessidade de se obter uma estimativa de parâmetros de uma superfície de segunda ordem e ainda, a redução do esforço experimental, levaram à utilização do Planejamento Composto Central (PCC).

CAPÍTULO 3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismos

Neste estudo foram utilizadas diferentes linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*:

- A linhagem *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, proveniente de Coleção de Cultura e gentilmente cedida pelo Dr. Ivano de Fillipis (INCQS/FIOCRUZ);
- Uma cultura isolada de *Landfarming* (REDUC/PETROBRAS), cedida pela Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro;
- E outra cultura, isolada neste estudo, de solo de uma lagoa contaminada com óleo diesel e gasolina, localizada na Fazenda Rio das Pedras no Município de Uberlândia, identificada como *Pseudomonas aeruginosa* e, posteriormente, denominada *Pseudomonas aeruginosa* de lagoa contaminada (PALC).

3.2. Fontes de carbono

Foi testado óleo de soja *in natura* (OSN), da marca ABC, produzido na região de Uberlândia;

3.2.1. Óleos vegetais residuais

Foram testados óleos de soja de diferentes origens:

- Óleo de soja residual (OSR), correspondendo a uma mistura de óleos, provenientes de subseqüentes frituras de alimentos diversos, recolhidos em várias lanchonetes onde é grande o seu descarte;
- Óleo de soja residual usado somente na fritura de carnes (OSRC), produzido no laboratório;
- Óleo de soja residual usado somente na fritura de salgados (OSRS), produzido no laboratório;
- Óleo de soja residual usado somente na fritura batatas (OSRB), produzido no laboratório.

Um volume de 5 L de cada tipo de óleo de soja acima descrito foi distribuído em frascos de vidro de 1 L de capacidade e armazenado sob refrigeração a 4°C, para

utilização durante todo o desenvolvimento do trabalho. Foi utilizada a mesma amostra para evitar qualquer variação de composição da matéria-prima.

3.2.2. Levedura residual cervejeira

Em alguns experimentos foi também empregada levedura inativa seca de cervejaria na elaboração dos meios. Este resíduo (Lote 2006-092) foi gentilmente cedido pela AmBev (Companhia de Bebidas das Américas) e sua composição é apresentada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Composição básica do resíduo seco (100% *Saccharomyces cerevisiae*)

Constituintes	**Concentração (g/kg)**
Umidade (máx.)	80
Proteína bruta (min.)	400
Matéria fibrosa (máx.)	30
Matéria mineral (máx.)	80
Aflatoxinas (máx.)	50 ppb

3.3. Meios de cultura

Os meios de cultura empregados durante a realização do trabalho são descritos a seguir:

3.3.1. Meio de cultura utilizado no isolamento dos microrganismos

Para o isolamento das culturas bacterianas foram utilizados os meios M1 e M2 propostos por Vecchiolli (1990), cujas composições são apresentadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Composição dos meios de cultura utilizados para o isolamento de microrganismos

Componentes	Concentração (g/L)	
	M1	M2
NaCl	5,0	5,0
K_2HPO_4	1,0	1,0
$NH_4H_2PO_4$	1,0	1,0
$(NH_4)_2SO_4$	1,0	1,0
$MgSO_4.7H_2O$	0,2	0,2
KNO_3	3,0	3,0
Agar bacteriológico	-	20,0

pH do meio ajustado em 7,0 utilizando NaOH 0,1N.

Esterilização por calor úmido à 1 atm/15 min.

3.3.2. Meio de cultura para a manutenção das cepas

As bactérias foram conservadas por repiques mensais, em tubos de ensaio contendo gelose nutriente (DIFCO 0003) inclinado. Após incubação por 48 horas em estufa a 30ºC, as culturas foram mantidas sob refrigeração a 4°C, para diminuir o metabolismo celular, até futura necessidade de uso.

3.3.3. Meio de cultura para o crescimento do microrganismo

Para o crescimento das culturas bacterianas para emprego como inóculo nos processos fermentativos foi empregado o meio proposto por Santos et al. (2002), conforme descrito na Tabela 3.3, visto a simples composição química e o seu baixo custo.

Tabela 3.3. Composição do meio de cultura utilizado para o crescimento dos microrganismos produtores de biossurfactantes

Componente	Concentração (g/L)
Glicose	10,0
Extrato de levedura	5,0
NH_4NO_3	1,7
$MgSO_4.7H_2O$	0,2
Na_2HPO_4	7,0
KH_2PO_4	3,0

pH do meio ajustado em 7,0 utilizando NaOH 0,1N.

Esterilização por calor úmido à 1 atm/15 min.

3.3.4. Meio de cultura utilizado no processo fermentativo

O meio empregado nos processos fermentativos para a produção de biossurfactantes (MPB) foi idealizado com base no(s) meio(s) descrito(s) por SANTOS et al. (2002), sendo constituído de óleo de soja residual, levedura cervejeira residual e de compostos inorgânicos, cuja composição está apresentada na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Composição do meio de cultura utilizado para a produção de biossurfactantes

Componente	Concentração (g/L)
MgSO4.7H2O	0,2
Na2HPO4	7,0
KH2PO4	3,0

Óleo de soja residual, nitrato de amônio e levedura cervejeira residual autolizada.
(De acordo com cada experimento).

Todos os meios foram esterilizados em autoclave à temperatura de 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, os frascos Erlenmeyers contendo os meios foram mantidos em câmara de fluxo laminar, sob luz ultravioleta, até atingir temperatura ambiente (em torno de 30°C). Antes do uso todos os meios foram submetidos a prova de esterilidade por incubação em estufa bacteriológica por 24 horas.

3.4. Seleção de microrganismos produtores de biossurfactantes

3.4.1. Coleta das amostras de solo contaminado

Inicialmente foram coletadas alíquotas do solo de uma lagoa contaminada com óleo diesel e gasolina para isolamento de culturas microbianas com capacidade de produzir biossurfactante. A lagoa está localizada na Fazenda Rio das Pedras, que faz divisa com o terminal de distribuição de combustível, situada no Distrito Industrial de Energia e Química de Uberlândia, no Km 20 da Rodovia MG-497. Esta lagoa recebe freqüentemente águas de chuvas e de lavagens do pátio do terminal, no qual há derrames rotineiros de gasolina e óleo diesel durante o enchimento dos tanques dos caminhões de transporte. A Figura 3.1 mostra a foto da divisa entre o terminal e a fazenda, e a Figura 3.2 mostra a foto das lagoas existentes nesta propriedade.

As amostragens do solo foram feitas conforme norma ABNT (NBR 10007/1987). Para tal, o solo de uma das lagoas contaminadas foi dividido em oito partes imaginárias, de forma a coletar uniformemente amostras do solo do fundo e da superfície da lagoa contaminada. As amostras coletadas das oito partes imaginárias foram então misturadas formando uma única amostra composta.

Figura 3.1. Foto das duas lagoas localizadas na Fazenda Rio das Pedras, mostrando a divisa do terminal de combustível com a propriedade.

As coletas foram feitas sempre usando frascos estéreis, que foram imediatamente lacrados e mantidos a 4°C durante o transporte. O processamento da amostra composta para isolamento das culturas microbianas foi feito dentro de um período de 24 h após a coleta.

Figura 3.2. Foto da lagoa mostrando a caneleta e o bocal de descarga do efluente na mesma.

3.4.2. Isolamento das estirpes microbianas

Com este propósito, 10 g da amostra composta do solo da lagoa foram incubados em frascos de 250 mL de capacidade, contendo 90 mL do meio M1 (Tabela 3.2) e 1% (v/v) de óleo de soja residual (OSR), em agitador rotatório (150 rpm) a 30°C por 72 horas. Após este período 9 mL do cultivo foram transferidos para novo meio, por três vezes consecutivas, adotando as mesmas condições de incubação acima mencionadas, totalizando 12 dias de adaptação.

Para o isolamento foi utilizada a técnica de plaqueamento em superfície usando o meio mineral M2 (Tabela 3.2) acrescido de 0,5% (v/v) de óleo de soja residual. Para tanto, a partir do último cultivo, ou seja, após adaptação dos microrganismos ao óleo de soja, foi tomada alíquota de 1 mL, foram feitas diluições decimais seriadas de 10^{-1} a 10^{-6} em solução fisiológica, sendo 0,1 mL de cada diluição distribuída, com auxílio de alça

de Drigalsky, na superfície do meio em placas de Petri. As colônias formadas foram repicadas para tubos de ensaio contendo agar M2 acrescido de 0,5% (v/v) de óleo de soja residual inclinado. As culturas foram sucessivamente plaqueadas, tantas vezes quantas necessárias, até a obtenção de culturas puras, o que foi comprovado por observações morfológicas macroscópicas das colônias formadas e pela análise da morfologia microscópica pela observação de preparações coradas pelo método de Gram (MADIGAN *et al.*, 2003).

3.4.3. Manutenção das linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*

As bactérias foram conservadas por repiques mensais, em tubos de ensaio contendo gelose nutriente (DIFCO 0003) inclinada. Após incubação por 48 horas em estufa a 30ºC, as culturas foram mantidas sob refrigeração a 4°C, para diminuir o metabolismo celular, até futura necessidade de uso. A pureza dos cultivos durante a manutenção da cultura e nos processos fermentativos foram periodicamente verificadas por observações microscópicas de preparações coradas pelo método de Gram (MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 2003).

3.4.4. Avaliação da produção de biossurfactantes pelos microrganismos isolados

Para identificar as estirpes mais promissoras quanto a produção de biossurfactante, 3 alçadas das culturas isoladas mantidas em gelose M2 inclinada foram usadas para inocular frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio M1 acrescido de 1% (v/v) de óleo de soja residual. Estes meios foram incubados sob agitação constante de 170 rpm a temperatura de 30 ± 1°C por 48 horas. Após este período, foram retiradas alíquotas de 50 mL, que após centrifugação à 12.500 rpm (correspondente a um campo centrífugo relativo de 18.900 g) por 20 min. para remoção das células, foram avaliadas quanto a tensão superficial. Estes experimentos foram realizados em triplicata para garantir a confiabilidade dos resultados. Foi selecionada para identificação a cultura cujo cultivo promoveu a maior redução da tensão superficial do meio.

3.4.5. Identificação da cultura microbiana

A linhagem bacteriana selecionada no item anterior foi identificada no Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), sob coordenação da Dra Dália dos Prazeres Rodrigues, através das Provas Clássicas de Bioquímica.

3.5. Experimentos

3.5.1. Preparação do inóculo e fermentação em incubadora rotativa

Inicialmente foi feita a ativação dos microrganismos por repiques da cultura estoque para tubos contendo meio gelose nutriente (DIFCO 0003) inclinado. Após incubação a 30 ± 1°C por 48 h, 3 alçadas da cultura microbiana foram cultivadas em 100 mL do meio de crescimento (Tabela 3.3) em frascos Erlenmeyers de 500 mL, a 30 ± 1°C, sob agitação de 170 rpm, em agitador oscilatório rotatório B. Braun – Biotech International, por 24 h.

Após este período, o meio contendo o inóculo foi transferido (10% m/v) para dez novos frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 50 mL de meio de produção (Tabela 3.4). Em seguida, eram colocados na incubadora rotativa (430 RDB da marca Nova Ética) por um período de 48 horas a 30 ±1 °C e 170 rpm.

Ao final do processo fermentativo, alíquotas dos mostos fermentados foram retiradas e centrifugadas a 13.000 x g à temperatura de 4°C para separação das células (biomassa), e os sobrenadantes obtidos foram analisados quanto a concentração de raminose, tensão superficial e índice de emulsificação.

3.5.2. Planejamentos experimentais fatoriais 2^4

Para a realização de experimentos significativos e confiáveis, utilizou-se um método científico de planejamento. Quando o problema envolve dados que podem conter erros experimentais, um modo adequado de analisar é por métodos estatísticos. Em qualquer experimento há duas etapas: o planejamento de experimentos e a análise estatística dos dados. Estas etapas estão intimamente ligadas, uma vez que o método a ser utilizado para a análise depende diretamente do planejamento realizado.

A organização de um planejamento fatorial consiste em selecionar os fatores (variáveis independentes do sistema) e escolher os níveis (valores assumidos pelas variáveis) que serão estudados. A determinação da quantidade de experimentos é feita de acordo com a quantidade de variáveis estudadas e com os níveis estipulados para essas variáveis. O planejamento é representado na forma de potência, fornecendo assim o número de experimentos a serem realizados.

A utilização do planejamento fatorial na realização dos experimentos permite avaliar quais as variáveis afetam a resposta estudada, se há interação entre as variáveis, quais delas são importantes e ainda a elaboração de modelos empíricos que relacionam a variável resposta aos fatores estudados (PORTO, 2001).

Com o intuito de selecionar a linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* e avaliar a tendência de algumas variáveis de processo para a produção do raminolipídeo, optou-se por realizar dois planejamentos experimentais a dois níveis com quatro variáveis (2^4), estabelecendo um total de 32 experimentos, contabilizado a réplica, para cada planejamento. No primeiro planejamento selecionou-se uma das duas linhagens estudadas e no segundo planejamento utilizou a linhagem selecionada no primeiro e a outra linhagem ainda não estudada e selecionou a linhagem a ser empregada no restante do estudo.

As quatro variáveis escolhidas foram:

- Concentração de óleo de soja residual (X_1);
- Concentração de nitrato (X_2);
- Concentração de levedura cervejeira residual (X_3);
- Linhagem do microrganismo (X_4).

Como resposta, adotaram-se as seguintes análises: produção de raminose, índice de emulsificação, tensão superficial e crescimento celular. Além disso, realizou-se o acompanhamento do pH. Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o *Software Statistica 5.1*.

Definido o planejamento a dois níveis, estabeleceu-se o nível superior, representado pelo sinal +1 das variáveis X_1, X_2 X_3 e X_4 como sendo, respectivamente concentração de óleo de soja residual de 15 g/L, concentração de nitrato de 13 g/L, concentração de levedura cervejeira residual 10 g/L e linhagem do microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* PALR e o nível inferior representado pelo sinal –1 das variáveis X_1, X_2, X_3 e X_4, como sendo respectivamente, concentração de óleo de soja

residual de 5 g/L, concentração de nitrato de 1 g/L, concentração de levedura cervejeira residual 0 e linhagem do microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Todos os experimentos foram realizados a 30 ± 1°C, com pH inicial do meio de 7,0 e o tempo de fermentação de 48 h.

Os níveis superiores e inferiores das variáveis: concentração de óleo de soja residual e nitrato de amônia foram selecionados através de consultas bibliográficas de forma que os valores apresentados na literatura estivessem entre os dois níveis do planejamento. (ZHANG *et al*, 1992; DESHPANDE *et al*, 1995; CHOUNG *et al*, 1999; TURKOVSKAYA *et al*, 1999; ABALOS *et al*, 2000; RAHMAN *et al*, 2000; CONTIERO *et al*, 2001; SANTA ANNA *et al*, 2001; BANAT *et al*, 2002; SANTOS *et al*, 2002).

Com relação à concentração de levedura cervejeira residual utilizou-se 0 g/L como nível inferior visando verificar a contribuição desta variável na produção de biossurfactante. Como nível superior adotou-se 10 g/L com base na literatura, considerando a concentração de extrato de levedo normalmente presente em meios de crescimento (SANTOS *et al,* 2002, MORIKAWA, M., *et al,* 2000; FOX, S.L., *et al,* 2000). Ressalta-se que no inicio do processo fermentativo, em todos os ensaios realizados, foram adicionados na ordem estabelecida de concentração inicial (X_0) 0,214 e 0,199 g/L células de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *P. aeruginosa* isolada PALR, respectivamente.

A matriz do planejamento utilizado está representada na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Matriz do planejamento experimental a dois níveis

Experimento	X_1 (g/L)	X_2 (g/L)	X_3 (g/L)	X_4
1	+1	+1	+1	+1
2	+1	+1	+1	-1
3	+1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1
5	+1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1
7	+1	-1	-1	+1
8	+1	-1	-1	-1
9	-1	+1	+1	+1
10	-1	+1	+1	-1
11	-1	+1	-1	+1
12	-1	+1	-1	-1
13	-1	-1	+1	+1
14	-1	-1	+1	-1
15	-1	-1	-1	+1
16	-1	-1	-1	-1

Experimento par utilizou-se a cultura *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (-1).
Experimento ímpar utilizou-se a cultura isolada *Pseudomonas aeruginosa* PALR (+1).
Experimentos com menor concentração adotou-se –1 e com a maior concentração +1.
Concentração inicial (X_0) 0,214 g/L células de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e 0,199 g/L células *P. aeruginosa* isolada PALR

Como mencionado acima, foi também realizado um segundo planejamento experimental para as mesmas variáveis independentes adotando os mesmos níveis com as culturas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (experimento par +1) e a cultura isolada *Pseudomonas aeruginosa* PALC (experimento ímpar -1). No inicio do processo fermentativo, para todos os ensaios realizados, foi adicionado na ordem estabelecida de concentração inicial (X_0) 0,28 e 0,3 ± 0,02 g/L células, para a *Pseudomonas aeruginosa* 9027 e *Pseudomonas aeruginosa* isolada PALC, respectivamente.

3.5.3. Planejamento experimental composto central

Os resultados dos planejamentos anteriores, além de possibilitar a seleção da melhor cultura microbiana, mostraram a tendência das variáveis estudadas. Assim, visando otimizar o processo em relação as seguintes variáveis operacionais: concentração óleo de soja residual, nitrato de amônio e levedura cervejeira residual, fez-se necessário realizar um planejamento composto central com 2^3 mais 2 réplicas no

ponto central mais 6 experimentos no ponto axial, com α de ortogonalidade igual a 1,287, resultando em 16 experimentos, conforme apresentado na Tabela 3.6.

Os níveis das variáveis estudadas foram colocados na forma codificada (adimencionalizada) na matriz de planejamento.

Tabela 3.6. Matriz de planejamento experimental (PCC) com três variáveis

Experimento	**Variáveis**		
	X_1	**X_2**	**X_3**
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	-α	0	0
10	α	0	0
11	0	-α	0
12	0	α	0
13	0	0	-α
14	0	0	α
15	0	0	0
16	0	0	0

X_1 – Concentração de óleo de soja residual (g/L);
X_2 – Concentração de nitrato de amônio (NH_4NO_3 em g/L);
X_3 – Concentração de levedura cervejeira residual (g/L).

Os níveis das variáveis estudadas foram colocados na forma codificada (adimensionalizada), utilizando a seguinte equação geral de codificação (Equação 3.1):

Equação geral: $X_n = [(X - X_0)]/(X_{+1} - X_{-1})/2$ (3.1)

Sendo: X é o valor da variável a ser calculado;

X_0 é o valor da variável no ponto central;

X_{+1} é o valor da variável no nível superior;

X_{-1} é o valor da variável no nível inferior.

As equações codificadas utilizadas no experimento são demonstradas pelas Equações 3.2, 3.3 e 3.4.

- Concentração de óleo de soja residual: X_1 = [OSR (g/L) – 22] / 16 (g/L) (3.2)
- Concentração de NH_4Cl: X_2 = [NA (g/L) – 5,625 (g/L)] / 4,375 (g/L) (3.3)

- Concentração de levedura cervejeira residual X_3 = [LCR (g/L) – 11,5] / 8,5 (g/L) (3.4)

O valor de α adotado foi de 1,287, determinado pela Equação (3.5), e que conduz a um PCC ortogonal, ou seja, um planejamento onde a matriz da variância e covariância é diagonal e os parâmetros não são correlacionados (BOX et al., 1978).

$\alpha = (QG/4)^{1/4}$ (3.5)

sendo, $Q = [(G + T)^{1/2} - G^{1/2}]^2$

G = número de pontos fatoriais ($G = 2^k$, se completo);

T = número de pontos adicionais no PCC $T = 2^k$ + número de réplicas centrais.

A Tabela 3.7 apresenta as concentrações empregadas em cada um dos 16 experimentos do PCC. Todos os experimentos foram realizados a 30 ± 1°C, com pH inicial do meio de 7,0 e o tempo de fermentação de 48 h. Utilizou-se no início do processo fermentaivo a concentração inicial (X_0) 0,3 ± 0,02 g/L células, na fase de crescimento exponenciais, para a *Pseudomonas aeruginosa* isolada PALC.

Tabela 3.7. Concentrações empregadas para cada variável nos 16 experimentos do PCC

EXPERIMENTO	ÓLEO RESIDUAL (g/L)	NITRATRO DE AMÔNIO (g/L)	LEVEDURA CERVEJEIRA RESIDUAL (g/L)
1	6	1,25	3
2	6	1,25	20
3	6	10	3
4	6	10	20
5	38	1,25	3
6	38	1,25	20
7	38	10	3
8	38	10	20
9	1,4	5,625	11,5
10	42,6	5,625	11,5
11	22	0	11,5
12	22	11,25	11,5
13	22	5,625	0,56
14	22	5,625	22,5
15 (C)	22	5,625	11,5
16 (C)	22	5,625	11,5

Todos os experimentos foram realizados com o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* PALC.

Definida a matriz do planejamento e as condições de cada experimento, partiu-se para a etapa seguinte que foi a realização dos experimentos, buscando a máxima fidelidade nas condições impostas pela matriz em cada corrida.

Após a coleta das amostras, foram realizados os testes de tensão superficial, índice de emulsão, produção de raminose e biomassa. Visando uma maior confiabilidade nos resultados obtidos, foram realizadas réplicas para cada experimento.

Realizadas todas as corridas e obtidas as suas respectivas respostas, iniciou-se o tratamento estatístico dos dados. A Equação (3.6) apresenta de forma completa a equação empírica de 2° ordem proposta, que representaria cada uma das respostas estudadas.

$$Y= \beta_0 + ax_1 + bx_2 + cx_3 + dx_4 + ex_1x_2 + fx_1x_3 + gx_1x_4 + hx_2x_3 + ix_2x_4 + jx_3x_4 + lx_1^2 + mx_2^2 + nx_3^2 + px_4^2 \quad (3.6)$$

Sendo:

- Y= resposta estudada;
- β_0= valor médio da resposta;
- a,b, c,....p= constantes ou parâmetro da equação;
- x_1= concentração de óleo de soja residual;
- x_2= concentração de nitrato de amônio;
- x_3= concentração de levedura cerejeira residual.

Foi realizada para cada resposta uma análise de regressão múltipla, pelo método dos mínimos quadrados, partindo-se da equação original (3.6) e feita uma aplicação estatística da estimativa dos parâmetros através dos valores de t de Student para cada um, sendo eliminados aqueles com nível de significância superior a 10%, ou seja, as variáveis relacionadas a estes são consideradas não relevantes. O valor da distribuição t de Student é importante para o cálculo da significância dos parâmetros e é definido como a relação entre o valor do parâmetro estimado e o seu desvio padrão.

O valor de F (Ficher) é determinado pela razão entre o quadrado médio da equação ajustada (QME) e o quadrado médio do resíduo (QMR), como mostra a Equação 3.7. O valor obtido para F pode ser usado para a realização de um teste de hipótese para a verificação da adequação aos dados experimentais. Quanto maior o valor de F, melhor será o ajuste do modelo em questão.

$$F = \frac{QME}{QMR} \tag{3.7}$$

O quadrado médio da equação (QME) e o quadrado médio do resíduo (QMR) são dados pelas Equações 3.8 e 3.9, respectivamente.

$$QME = \frac{\text{Soma dos quadrados dos valores preditos}}{\text{Numero de graus de liberdade da equação}} \tag{3.8}$$

$$QMR = \frac{\text{Soma dos quadrados do residuo}}{\text{Numero de graus de liberdade do residuo}} \tag{3.9}$$

O coeficiente de correlação quadrático R^2 e a comparação entre o F calculado (F_C) e o F tabelado (F_T) foram utilizados para a constatação da significância ou não do modelo. Eliminando os parâmetros não significativos, definiu-se para cada uma das respostas estudadas uma equação que representa os efeitos das variáveis do processo nestas, e a determinação das variáveis que mais afetam a resposta. O resíduo da estimação é definido como a diferença entre os resultados experimentais e os previstos pela Equação 3.10. Na análise dos resíduos, os gráficos devem ser aleatórios e independentemente distribuídos para comprovar a validade das equações.

$$\varepsilon = Y_{\exp} - Y_t \tag{3.10}$$

Sendo ε, $Y_{\exp}$ e Y_t correspondem a resíduo de estimação, resultado experimental e resultado teórico, respectivamente.

3.5.4. Produção de biossurfactante em biorreator

Com o objetivo de estudar a importância da vazão de ar e a velocidade de agitação durante a fermentação com a cepa isolada de Pseudomonas aeruginosa PALC na obtenção de maiores rendimentos de raminolipídeos, foi realizado um planejamento fatorial completo com nove experimentos com variações nos valores de aeração em vvm (0,5; 1,0 e 1,5) e agitação em rpm (300; 550 e 800), sendo avaliados como variáveis respostas a produção de raminose (RM), índice de emulsão (IE) e tensão superficial (TS).

Todos os ensaios foram realizados em biorreator (modelo BIOFLO IV, New Brunswick Scientific Co. Inc.) com capacidade para 3L, contendo 1,2L de volume de trabalho. O volume de inóculo variou de acordo com a densidade microbiana do pré-inóculo, sendo utilizado um valor correspondente a concentração inicial de células de 0,3 ± 0,02 g/L no meio de produção.

Durante 48 horas de processo, foram mantidas constantes a temperatura e pH em 30±1°C e 7,0 respectivamente, em mesa de agitação a 170 rpm. As amostras de espuma eram periodicamente (ou continuamente) retiradas com a ajuda de um coletor de espuma, situado na parte interna do reator, logo acima da superfície de caldo.

Os cálculos da otimização para as variáveis: velocidade de agitação e taxa de aeração foram realizados a partir de um algoritmo realizado no programa Maple VIII release 4 a partir da equação completa do modelo (Equação 3.6) que relaciona a resposta estudada em função das variáveis.

A matriz do planejamento utilizado está representada na Tabela 3.8.

Tabela 3.8. Matriz do planejamento fatorial completo a três níveis

Experimentos	Aeração (vvm)	Agitação (rpm)
1	300	0,5
2	300	1,0
3	300	1,5
4	550	0,5
5	550	1,0
6	550	1,5
7	800	0,5
8	800	1,0
9	800	1,5

Os níveis das variáveis estudadas foram colocados na forma codificada (adimensionalizada), utilizando a seguinte equação geral de codificação (Equação 3.1):

As equações codificadas utilizadas no experimento são demonstradas pelas Equações 3.11 e 3.12.

- Taxa de aeração: X1 = [aeração (vvm) – 1,0] / 0,5 (vvm) (3.11)

-Velocidade de agitação: X2 = [agitação(rpm) – 550 (vvm)] / 250 (vvm) (3.12)

3.5.5. Regulação e processo fermentativo dos raminolipídeos

Realizaram-se duas fermentações utilizando as melhores condições experimentais definidas no PCC e no Planejamento Fatorial Completo. A primeira fermentação foi realizada sem o acréscimo de óleo de soja residual no meio fermentado, com o objetivo de verificar a influência da levedura cervejeira residual como fonte de carbono na produção de biossurfactantes. A segunda fermentação foi realizada sem a adição dos sais inorgânicos $MgSO_4.7H_2O$, Na_2HPO_4 e KH_2PO_4, com o intuito de verificar a influência dos mesmo na produção de biossurfactantes e o efeito do tamponamento no meio de cultivo.

3.5.6. Estudo comparativo da produção de biossurfactante a partir de óleos diferentemente processados

Visando a comparação da produção de raminose a partir de óleos diferentemente processados foram realizados ensaios utilizando como fonte de carbono óleo de soja in natura (OSN), óleo de soja residual proveniente da fritura de diversos alimentos (OSR) e óleo de soja de frituras em separado de carnes (OSRC), salgados (OSRS) e batatinha (OSRB).

3.6. Recuperação de biotensoativos

Para recuperação dos compostos biotensoativos utilizaram-se dois métodos: extração orgânica e coluna de adsorção.

Os raminolipídeos foram separados das células por centrifugação (12.500 rpm, 20 °C, 20 min), e o sobrenadante foi acidificado pH 2,0 com HCl 4,0 N, mantido sob refrigeração a 4 ºC em *overnight.* O raminolipídeo precipitado foi recuperado por centrifugação (18,900 g, 4 °C, 30 min), ressuspendido com 5 mL de HCl 0,04 N, e extraído com o mesmo volume (5 mL) de clorofórmio e etanol 2:1. A fase orgânica foi separada (funil de separação), e a solução foi colocada em evaporador a vácuo por 30 min a 62 °C (Rahman *et al*, 2002)

Foi realizado teste de extração de raminolipídeos utilizando-se o método descrito por Sana Anna *et al* (2002), onde o resultado do raminolipídeo precipitado foi recuperado por centrifugação (18,900 g, 4 °C, 30 min), ressuspenso com HCl 0,04 N, e extraído com o mesmo volume de acetato de etila. A fase orgânica foi separada, secada com MgSO4, e a solução foi colocada em evaporador a vácuo por 30 min a 62 °C.

Utilizando-se o método de recuperação de biotensoativos por coluna de adsorção, o caldo de cultivo (livre de células) foi eluído em coluna de adsorção contendo resina de poliestireno Amberlita XAD-2 (Supelco), como descrito por REILING *et al* (1986). A coluna de vidro, contendo 200 g de resina foi primeiramente equilibrada em tampão fosfato 0,1M com pH 6,1. Posteriormente, o material obtido do caldo de cultivo foi eluído. A adsorção de compostos tensoativos foi verificada pela medida de tensão superficial do material retirado da coluna. Quando a tensão superficial era menor que 35,0 dina/cm, indicando que a coluna estava saturada, procedeu-se sua lavagem com um volume de água destilada igual 2 leitos. A eluição do biossurfactante foi realizada lavando-se a coluna com metanol. O metanol contendo o produto foi, então, evaporado em estufa a vácuo (2 h a 60 °C), obtendo-se assim a mistura de raminolipídeos.

3.7. Cinética

A fermentação foi conduzida em biorreator (*B. Braun Biotech Internacional*) de 6L de capacidade com volume útil de 3,2 L com duração máxima de 96 horas, sob agitação de 550 rpm e aeração de 0,5 vvm a 30 ±1 °C. Os experimentos foram realizados, no reator de 6 litros, nas mesmas condições de inóculo, fontes de carbono e nitrogênio, agitação, aeração e k_La (coeficiente volumétrico de oxigênio dissolvido) usados para produção de biossurfactante em reator de 3 litros para comparar a reprodutibilidade dos resultados.

Visando a convalidação do modelo cinético foi realizado também o estudo cinético em reator de 3L nas mesmas condições experimentais do reator de 6L.

3.7.1. Modelagem da produção fermentativa de raminose

A identificação paramétrica foi possível a partir dos resultados experimentais de ensaios efetuados sob condições controladas. Os valores dos parâmetros foram obtidos

por uma técnica de regressão não-linear, usando um algorítmo de resposta múltipla (Marquardt, 1963).

A integração do conjunto de equações diferenciais para o cálculo dos parâmetros por ajuste aos dados experimentais foi realizada com auxílio de um algoritmo de Runge-Kutta de quarta-ordem.

A identificação paramétrica é ilustrada por uma boa correlação, entre os valores experimentais e aqueles fornecidos pelo modelo. O desvio padrão do erro dos parâmetros na regressão não-linear foi calculado, junto com a soma dos quadrados dos resíduos.

3.7.2. Construção do modelo cinético

As equações do modelo expressam o crescimento, o produto e o consumo dos nutrientes como uma função somente da biomassa e sua evolução no tempo.

As mudanças na biomassa e produção de raminolipídeos foram representadas pelas Equações (3.13) e (3.14), respectivamente. A evolução dos três nutrientes avaliados com o tempo foi definida pelas Equações (3.15), (3.16) e (3.17).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \; ; \tag{3.13}$$

$$\frac{dRam}{dt} = \lambda \frac{dX}{dt} \; ; \tag{3.14}$$

$$\frac{dNO_3}{dt} = -\alpha \frac{dX}{dt} \; ; \tag{3.15}$$

$$\frac{dPt}{dt} = -\beta \frac{dX}{dt} \; ; \tag{3.16}$$

$$\frac{dNt}{dt} = -\gamma \frac{dX}{dt} \; ; \tag{3.17}$$

- Sendo X a concentração de biomassa residual (g X/L);
- Ram a concentração de raminolipídeo (g Ram/L);
- NO_3 a concentração de nitrato (g NO_3/L);
- Pt a concentração de fósforo total (g Pt/L);
- Nt a concentração de nitrogênio total (g Nt/L).

Nestas equações os termos μ (1/h), λ (g Ram/g biomassa/h), α (g NO_3^-/g biomassa/h) β (g Pt/g biomassa/h) e γ (g Nt/g biomassa/h) representam a velocidade específica de crescimento, o rendimento de raminolipídeos e os rendimentos de consumo dos três nutrientes (nitrato, fósforo total e nitrogênio Kjeldahl total) em relação ao crescimento celular.

3.7.3. Modelagem do crescimento celular

A taxa de crescimento (μ) foi expressa como uma função unicamente da biomassa pela utilização da equação logística descrita por Verhulst (1844), Pearl e Reed (1920) apud Bailey (1986). [Equação (3.18)].

$$\mu = \mu_{\max}\left(1 - \frac{X}{X^*}\right) \tag{3.18}$$

Sendo μ_{max} a velocidade específica máxima de crescimento (1/h) e X^* a máxima concentração celular obtida.

3.7.4. Modelagem das outras funções

O modelo investigado nesse estudo para a formação de raminose e consumo de nutrientes foi dado pelas equações de Luedeking-Piret [Equações (3.14), (3.15), (3.16) e (3.17)].

3.8. Análises quantitativas

3.8.1. Morfologia

O estudo da morfologia microscópica foi fundamental para a obtenção de culturas puras durante o isolamento e para determinação da pureza dos cultivos durante os experimentos.

Microscópica - as células microbianas foram observadas por meio de preparações coradas pela técnica de Gram (MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 2003) em microscópio ótico OLYMPUS modelo cover 018.

Identificação – algumas das células microbianas foram identificadas pelo Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) através de Bioquímica Clássica.

3.8.2. Concentração de fósforo total

As concentrações de fósforo totais foram determinadas pela digestão de ácido perclórico em reação com molibidato de amônio e acido ascórbico conforme descrito no Standart methods 20th, 1998.

3.8.3. Concentração de nitrogênio Kjeldahl total (NKT)

As concentrações de NKT foram determinadas pelo método titulométrico após digestão com ácido sulfúrico e catalisados com sulfato de cobre e potássio ascórbico conforme descrito no Standart methods 20th, 1998.

3.8.4. Concentração de nitrato

A determinação de nitrato consumido foi pela adaptação do método colorimétrico a partir do nitrato precipitado utilizando a metodologia descrita nas normas do Instituto Adolfo Lutz, 1985.

3.8.5. Tensão superficial

A produção microbiana de biossurfactante foi indiretamente determinada pela redução da tensão superficial do meio de cultura, após o cultivo do microrganismo. Com este fim, amostras dos meios fermentados, previamente centrifugadas a 12500 rpm a 12ºC por 25 minutos para remoção das células, foram analisadas em tensiômetro da marca Fisher (modelo 21).

A medida da tensão superficial foi feita em alíquota de 10 mL utilizando pequenas placas de Petri. As análises foram realizadas a 25°C e o aparelho foi previamente calibrado com pesos aferidos. Nos testes foi utilizado um anel de platina-iridium com 2 cm de diâmetro e 6,0 cm de altura que era imerso no líquido a ser analisado. Cada experimento teve sua tensão superficial medida por três vezes e como resultado foi considerada a média das três medidas.

3.8.6. Concentração de raminose

A concentração de raminose foi determinada de acordo com o método descrito por RAHMAN (2002). O teste consiste em adicionar 1 mL da amostra a 4,5 mL de

ácido sulfúrico (70%). Em seguida, misturar vigorosamente a solução e aquecê-la a 100ºC por 10 minutos, esfriando-a a seguir até atingir a temperatura ambiente, quando é adicionada à mistura 0,1 mL de solução recém-preparada de ácido tioglicólico (3%). Após repouso por 3 horas na ausência de luz é feita a leitura da absorbância no comprimento de onda de 420 nm, quando foi utilizado o espectrofotômetro da marca Genesys (modelo 10UV). O valor da absorvância foi relacionado com a concentração de raminose através de curva de calibração previamente construída, onde a aborvância de 0,5 correspondeu a concentração de raminose de 0,15 g/L.

3.8.7. Índice de emulsificação

A atividade emulsificante foi determinada de acordo com o método descrito por COOPER e GOLDENBERG (1987). O teste consiste em adicionar 6 mL de querosene de aviação à 4 mL do caldo fermentado centrifugado, contido em tubo de ensaio (1,8 x 15 cm) e tampa de rosca.

Após agitação vigorosa em vortex por 2 minutos, a emulsão formada foi deixada em repouso por 24 horas. O índice de emulsão (E24), um valor percentual, corresponde à altura da camada emulsionada dividida pela altura total do líquido, multiplicada por 100, conforme Equação 3.19.

$$E_{24}(\%) = \frac{H_{EM}}{H_t x 100} \tag{3.19}$$

Sendo: H_{EM} = altura da camada emulsionada

H_t = altura total do líquido

3.8.8. Biomassa

A biomassa foi determinada através da sua massa seca. Para tanto, amostras do meio fermentado foram centrifugadas (centrifuga da marca Beckman Coulter J – 25) 12500 rpm por 15 minutos. As células precipitadas foram lavadas e centrifugadas por mais três vezes em água destilada. Após a ultima centrifugação, as células foram suspensas em água destilada e transferidas para cápsulas de porcelanas previamente taradas e levadas à estufa a 80°C por 24 horas. A determinação da massa seca foi feita pela diferença dos pesos final e inicial das cápsulas.

3.8.9. Concentração de oxigênio dissolvido

Durante os cultivos realizados em biorreator, a pressão parcial de oxigênio dissolvido foi monitorada por eletrodo polarográfico esterilizável METTLER TOLEDO.

3.8.10. Procedimento de calibração do eletrodo

Para a calibração do eletrodo, passou-se uma corrente de nitrogênio, até todo o oxigênio ser expulso. Isto foi verificado pela estabilização da leitura da pressão parcial de oxigênio (pO2) em valores próximos a 0% de saturação em oxigênio. Neste momento definiu-se 0% de saturação de O2.

A seguir, alterou-se a corrente, passando-se ar no sistema. No momento da saturação do meio com ar, considerou-se o valor obtido como 100% de saturação. Este procedimento foi feito por três vezes, na própria cuba de fermentação, após esterilização, nas condições de operação (pH, temperatura e meio de cultivo).

3.8.11. Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La) em biorreator contendo o meio MPB.

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (KLa) inicial foi determinado com base no método "gassing-out", descrito por WISE, citado por RAINER (1990), que prevê a utilização de eletrodos com princípio polarográfico para medida da pressão parcial de oxigênio. Este método é indireto, ou estático, por ser realizado na ausência de células e ter como princípio, a medida da absorção de oxigênio em uma solução.

Inicialmente, o biorreator foi preenchido com o meio MPB e as condições de operação foram ajustadas. Em seguida, a concentração de oxigênio dissolvido no líquido foi reduzida a zero pela passagem de nitrogênio. As leituras das concentrações de oxigênio dissolvido foram realizadas em percentual de saturação, em intervalos de 30 segundos, com a finalidade de construir um gráfico relacionando a quantidade de oxigênio dissolvido no meio em função do tempo, a fim de determinar os valores de K_La (coeficiente global de transferência de oxigênio).

Neste momento, foi reiniciada a aeração do meio e registrada a variação da concentração de oxigênio dissolvido em relação ao tempo.

A Equação 3.20 descreve a variação da concentração de oxigênio dissolvido com o tempo.

$$\ln\left(1-\frac{C}{C^*}\right)\frac{\mathrm{dC}}{\mathrm{dt}} = K_L a(C^* - C) \tag{3.20}$$

Sendo C* - concentração de oxigênio dissolvido na saturação (mmol/L).

C - concentração de oxigênio dissolvido no instante t (mmol/L).

Sua solução fornece a equação 3.21:

$$\int_{C=0}^{C=C^*} \frac{dC}{(C^* - C)} = \int_{t=0}^{t=t} K_L a.dt \tag{3.21}$$

Rearranjando e integrando a Equação 3.21, tem-se a Equação 3.22 e 3.23:

$$\ln\left(\frac{C^* - C}{C^*}\right) = -K_L a.t \tag{3.22}$$

e

$$\ln\left(1-\frac{C}{C^*}\right) = -K_L a.t \tag{3.23}$$

A Equação 3.15, mantém uma correlação linear entre o $\ln\left(1-\frac{C}{C^*}\right)$ e o tempo, onde o coeficiente angular da reta fornece o valor de K_La.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da produção de biossurfactante pelos microrganismos isolados

Este Experimento teve como objetivo selecionar dentre as 10 culturas microbianas isoladas as que apresentavam a capacidade de reduzir a tensão superficial do meio, um indicativo da própria hidrofobicidade da célula ou da capacidade de produção de biossurfactantes. A Tabela 4.1 mostra os resultados de tensão superficial determinados para todas as culturas puras, isoladas de solo contaminado, após cultivo no meio mineral básico M1 acrescido de 1% (v/v) de óleo de soja residual, à temperatura de 30 ± 1 °C, sob agitação de 170 rpm, por 48 horas.

Dentre as 10 estirpes bacterianas isoladas, 4 foram capazes de reduzir a tensão superficial do meio, estabelecendo percentuais de redução da tensão superficial superiores a 35%. Conforme citado por COOPER (1986), um microrganismo é considerado promissor se produz composto tensoativo capaz de reduzir a tensão superficial a valores inferiores a 40 dina/cm. Contudo, um biossurfactante é considerado eficiente quando este valor for igual ou inferior a 35 dina/cm.

Tabela 4.1. Valores da tensão superficial após cultivo dos microrganismos isolados em meio mineral (M1) acrescido de 1% de óleo de soja residual, e respectivas percentagens de redução da tensão superficial do meio

Linhagem bacteriana	Tensão Superficial (dina/cm)	Redução da tensão superficial (%)
L1	63,7 ± 0,8	6,3
L2	42,3 ± 0,5	37,8
L3	58,7 ± 1,0	13,7
L4	66,3 ± 0,5	2,5
L5	33,5 ± 1,0	50,7
L6	51,9 ± 0,8	23,7
L7	61,4 ± 1,0	10,7
L8	36,7 ± 0,3	46,0
L9	65,9 ± 0,5	3,1
L10	39,4 ± 0,8	42,1

Tensão superficial inicial do meio M1: 68 ± 1 dina/cm; tempo de processo: 48 horas.

Considerando os dados da literatura, pode-se definir a estirpe L5 como potencialmente produtora de agente tensoativo. Por isso, o mosto resultante do cultivo desta cultura microbiana também foi testado quanto à atividade emulsificante. Sabe-se que uma das propriedades de interesse dos biossurfactantes é sua capacidade de emulsificar líquidos não miscíveis formando emulsões estáveis (PORTER, 1994; DESAI & BANAT, 1997). Para essa estirpe foi determinado um índice de emulsificação de 70%; resultado que é bastante promissor de acordo com dados já publicados (REIS *et al.*, 2004). Portanto, esta cultura foi selecionada.

A análise da cultura microbiana selecionada através de preparações coradas pelo método de Gram revelou a presença de formas de bastonetes retos, pequenos e finos, de mesma morfologia, e Gram-negativos. Posteriormente, a cultura microbiana foi identificada como pertencente à espécie *Pseudomonas aeruginosa, passando* a ser denominado de linhagem PALC (*Pseudomonas aeruginosa* de lagoa contaminada).

4.2. Planejamento fatorial a dois níveis para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *P. aeruginosa* PALR

Os resultados obtidos no planejamento fatorial a partir das variáveis estudadas: concentração de óleo de soja residual (OSR), concentração de nitrato de amônio (NA), levedura cervejeira residual (LCR) para as linhagens *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e a PALR, encontram-se na Tabela 4.2. A partir das respostas obtidas para a produção de raminose (RM), tensão superficial (TS), índice de emulsificação (IE) e concentração final de células (X_f), foram construídos os Diagramas de Pareto, indicados, respectivamente, nas Figuras 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4.

Tabela 4.2. Resultados médios de produção de raminose, índice de emulsificação, tensão superficial e crescimento celular obtidos durante a realização dos Experimentos com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *P. aeruginosa* PALR

Exp.	OSR (g/L)	NA (g/L)	LCR (g/L)	Microrganismo	RM (g/L)	IE (%)	TS (dina/cm)	X_f (g/L)
1	15	13	10	PALR	0,16	50	36,10	3,03
2	15	13	10	ATCC 9027	0,25	50	34,20	3,21
3	15	13	0	PALR	0,15	30	37,70	3,08
4	15	13	0	ATCC 9027	0,31	68	33,50	3,14
5	15	1	10	PALR	0,25	60	33,90	3,36
6	15	1	10	ATCC 9027	0,59	84	31,00	4,59
7	15	1	0	PALR	0,17	50	35,60	2,95
8	15	1	0	ATCC 9027	0,42	76	31,60	4,44
9	5	13	10	PALR	0,15	40	37,00	2,53
10	5	13	10	ATCC 9027	0,38	70	32,00	4,33
11	5	13	0	PALR	0,13	30	38,00	2,27
12	5	13	0	ATCC 9027	0,33	62	32,80	4,05
13	5	1	10	PALR	0,21	54	35,50	2,70
14	5	1	10	ATCC 9027	0,77	100	28,00	4,22
15	5	1	0	PALR	0,13	28	38,10	2,27
16	5	1	0	ATCC 9027	0,46	78	31,50	4,10

Concentração de óleo residual (OSR); Concentração de nitrato de amônia (NA);
Concentração de levedura cervejeira residual (LCR); Concentração de raminose (RM);
Índice de emulsão(IE); Tensão superficial (TS); Concentração final de células (X_f)
Concentração inicial de células: em torno de 0,2 g/L.
Experimento par utilizou a cultura *P. aeruginosa* ATCC 9027 (-1).
Experimento ímpar utilizou a cultura isolada *P. aeruginosa* PALR (+1);
Foi adotado o nível +1 para a variável de maior concentração e –1 para a variável de menor concentração.
Tensão superficial inicial do meio de produção 62 dina/cm ± 1 (com 10 g/L de LCR) e 65 dina/cm ± 1 (sem LCR).

Através da Tabela 4.2 e do gráfico de Pareto (Figura 4.1), verifica-se que as variáveis que influenciaram na síntese da raminose foram X_2 (concentração de nitrato), X_3 (concentração de levedura cervejeira residual), X_4 (linhagem de microrganismo), X_1X_4 (óleo/microrganismo), X_2X_3 (sal de nitrato/levedura cervejeira residual) e X_2X_4 (nitrato/microrganismo). Neste planejamento fatorial para a análise de todas as respostas, os parâmetros com nível de significância maior que 10% em um teste de hipótese utilizando t de Student foram desprezados.

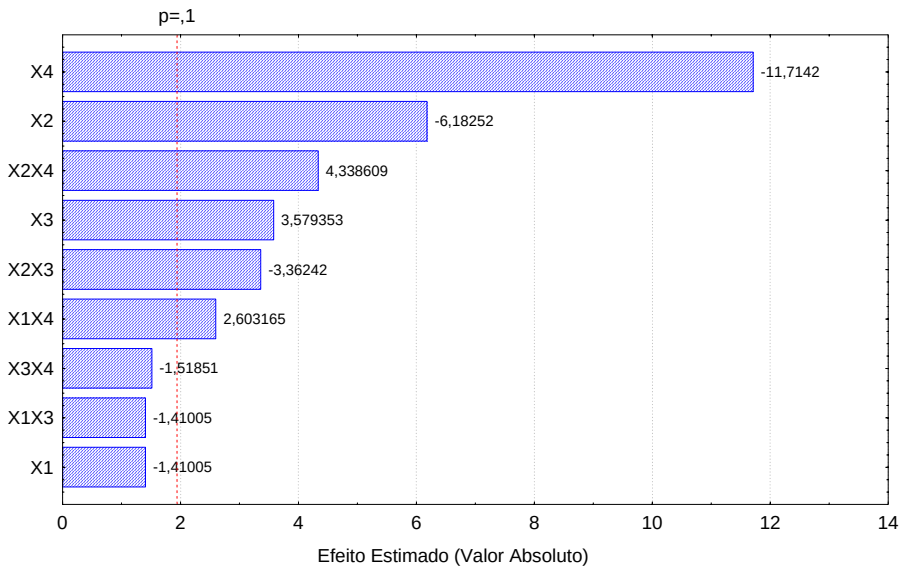


Figura 4.1. Diagrama de Pareto, mostrando a contribuição das variáveis estudadas para a produção de raminose.

Observa-se, pelo diagrama de Pareto, que a variável que mais influenciou no aumento da concentração de raminose foi a linhagem microbiana. O sinal negativo referente à X_4 significa que esta variável quando passa de um nível + 1 (*P. aeruginosa* PALR) para o nível -1 (*P. aeruginosa* ATCC 9027), aumenta a resposta (produção de raminose).

Como a variável X_4 é uma variável qualitativa e a equação do modelo empírico deve ser em função das variáveis quantitativas, fez-se necessário a correção da equação ajustada substituindo a variável X_4 pelo valor –1 ou +1 de forma a maximizar as respostas de concentração de raminose, índice de emulsificação e de crescimento celular, e minimizar a resposta tensão superficial. Este procedimento foi adotado para as demais equações ajustadas para as respostas anteriormente mencionadas. Sendo assim, a equação ajustada para a resposta síntese de raminose em função da variável correção X_1, X_2, X_3 e X_2X_3 pode ser representada como segue (Equação 4.1):

$$\text{Raminose} = 0{,}574 - 0{,}060X_1 - 0{,}243X_2 + 0{,}083X_3 - 0{,}078X_2X_3 \qquad (4.1)$$

O valor do coeficiente de determinação (R^2) mostram que cerca de 94% dos dados experimentais se ajustam ao modelo.

Os sinais negativos das variáveis X_1 e X_2 mostram que menores valores nas concentrações de óleo de soja residual e de nitrato de amônio promovem maiores produções de raminose e, consequentemente, do biossurfactante. Esse comportamento

pode ser comprovado pela comparação dos resultados obtidos nos Experimentos: 1 e 13; 2 e 14; 4 e 16. O sinal positivo de X_3 mostra que aumentando a concentração de levedura cervejeira residual aumenta-se a produção de raminose, Experimentos 5 e 7; 13 e 15; 14 e 16.

Pela Tabela 4.2 e gráfico de Pareto (Figura 4.2), verifica-se que as variáveis que influenciaram na redução da tensão superficial foram X_2 (concentração de nitrato), X_3 (concentração de levedura cervejeira residual), X_4 (linhagem microbiana), X_1X_4 (óleo/microrganismo), X_2X_3 (nitrato/ levedura cervejeira residual).

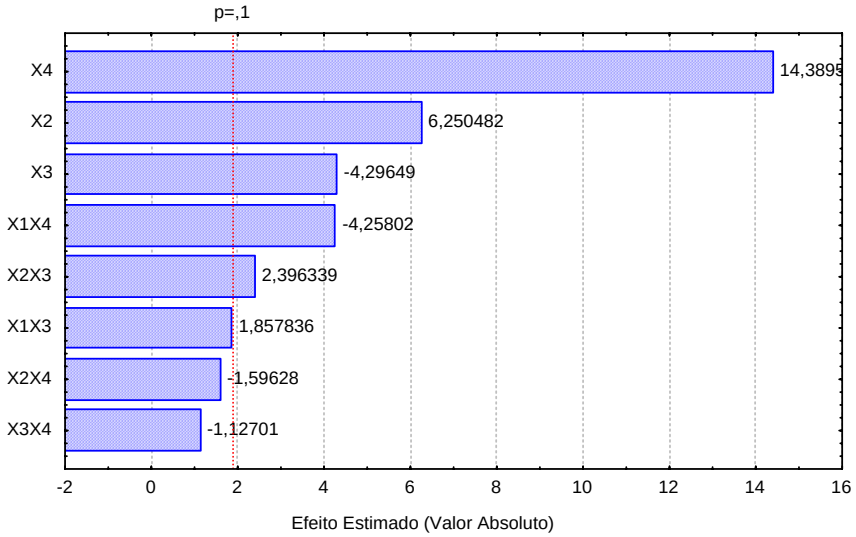


Figura 4.2. Diagrama de Pareto mostrando a contribuição das variáveis estudadas na redução da tensão superficial.

Verifica-se que a variável que mais influenciou na redução da tensão superficial foi à linhagem do microrganismo. O sinal positivo referente à X_4 significa que esta variável, quando passa de um nível +1 (PALC) para o nível –1 (ATCC 9027) reduz a tensão superficial.

A Equação 4.2 apresenta a resposta ajustada para a tensão superficial em função das variáveis codificadas quantitativas X_1, X_2, X_3 e X_2X_3.

$$\text{Tensão superficial} = 29{,}477 + 1{,}384X_1 + 2{,}031X_2 - 1{,}396X_3 + 0{,}778X_2X_3 \quad (4.2)$$

O valor obtido para o quadrado do coeficiente de determinação 0,95, significa que houve um bom ajuste dos dados experimentais ao modelo representado pela Equação 4.2.

Os sinais das variáveis X_1 e X_2 mostram que menores valores das concentrações de óleo de soja residual e de nitrato (Experimentos 2 e 14; 4 e 16) são mais indicados visto que levam a menores valores de tensão superficial. O sinal negativo de X_3 mostra que o aumento da concentração de levedura cervejeira residual também propicia a redução da tensão superficial (Experimentos 1 e 3; 5 e 7; 10 e 12; 13 e 15; 14 e 16).

A redução da tensão superficial de um meio aquoso é um indicativo de produção de tensoativo. De fato, quanto maior a quantidade de surfactante, menor a tensão superficial. No entanto, os valores mínimos de tensão superficial estão na faixa de 25 a 28 dina/cm (REISER *et al*, 1993), posto que a partir de uma dada quantidade de biossurfactante, que corresponde à concentração micelar crítica, a tensão superficial se mantém constante. Portanto, os resultados obtidos mostram que as duas linhagens são capazes de eficazmente produzir biossurfactante a partir de óleo de soja residual, embora a linhagem isolada tenha sobrepujado a cultura de coleção.

No gráfico de Pareto (Figura 4.3), verifica-se que as variáveis que influenciaram no índice de emulsificação foram X_2 (concentração de nitrato), X_3 (concentração de levedura cervejeira residual), X_4 (linhagem) e X_1X_4 (óleo/microrganismo).

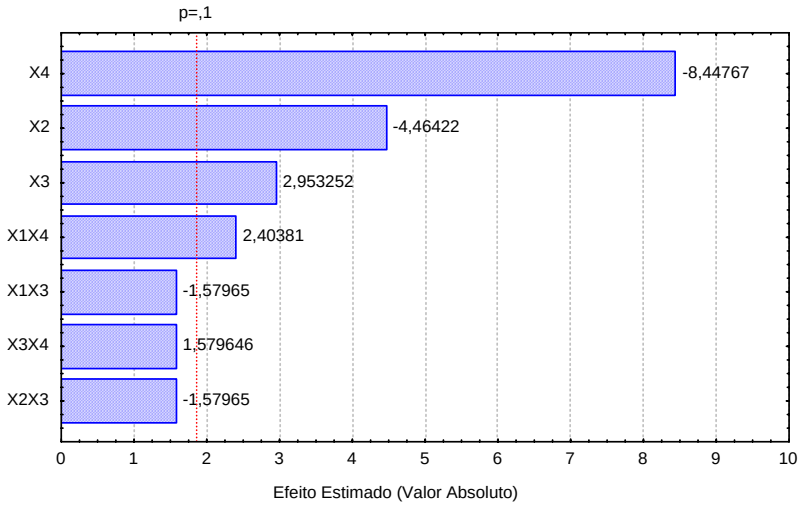


Figura 4.3. Diagrama de Pareto mostrando a contribuição das variáveis estudadas para o índice de emulsificação.

Verifica-se, novamente, que a variável que mais influenciou no aumento do índice de emulsificação foi a origem da cultura microbiana. O sinal negativo referente à X_4 significa que esta variável quando passa de um nível +1 para o nível –1, aumenta a resposta (índice de emulsificação).

A Equação 4.3 representa a resposta ajustada para o índice de emulsificação em função da variável correção X_1, X_2 e X_3:

$$\text{Índice de emulsificação} = 73{,}5 - 4{,}375X_1 - 8{,}125X_2 + 5{,}375X_3 \qquad (4.3)$$

O valor obtido para o quadrado do coeficiente de determinação dessa equação foi de 0,87. Isso confirma que 87% da variabilidade dos dados foram explicados pela Equação 4.3.

Os sinais negativos das variáveis X_1 e X_2 mostram o mesmo comportamento analisado para a produção de raminose, em relação ao índice de emulsificação, ou seja, menores valores nas concentrações de óleo de soja residual e nitrato geram maiores índices de emulsão (2 e 14; 4 e 16). O sinal positivo de X_3 mostra que o aumento do índice de emulsificação está diretamente relacionado ao aumento da concentração de levedura cervejeira residual, conforme pode ser observando comparado analisando os Experimentos 1 e 3; 5 e 7; 6 e 8; 13 e 15; 14 e 16.

Através da Tabela 4.2 e do gráfico de Pareto (Figura 4.4), verifica-se que X_4 e X_1X_4 foram as variáveis que mais influenciaram no crescimento celular.

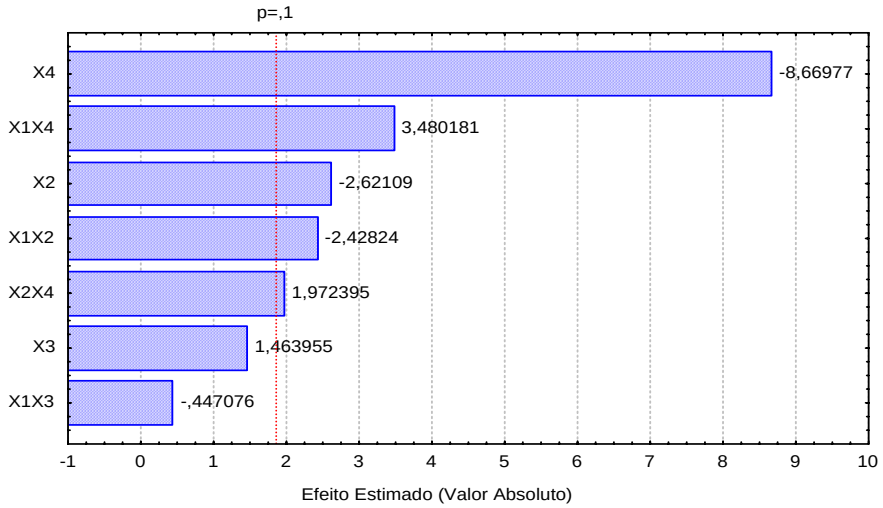


Figura 4.4. Diagrama de Pareto mostrando a contribuição das variáveis estudadas para o crescimento celular.

Nota-se, novamente, que a variável que mais influenciou no aumento do crescimento foi à origem da linhagem. O maior crescimento celular foi observado para *Pseudomonas* ATCC 9027, o que sugere que o biossurfactante é um metabólito secundário; donde quanto mais biomassa for gerada, maior a formação do bioproduto.

A Equação 4.4 do modelo ajustado para a resposta crescimento celular foi representada por:

$$\text{Crescimento celular} = 4{,}013 - 0{,}248X_1 - 0{,}326X_2 - 0{,}174X_1X_2 \quad (4.4)$$

O valor obtido para R^2 foi de 0,91 indicando que 91% da variabilidade dos dados para crescimento celular foram explicados pela Equação 4.4. Esta equação mostra que menores valores nas concentrações de óleo de soja residual e nitrato de amônio promovem aumento no crescimento celular. Esses resultados corroboram a indicação de ser o biossurfactante, um produto do metabolismo secundário.

Conforme resultados apresentados pelos gráficos de Pareto, a variável que mais influenciou nas repostas foi a origem da bactéria.

Pelos valores obtidos na Tabela 4.2 e análise dos gráficos de Pareto, conclui-se que a linhagem *Pseudomonas* ATCC 9027 apresentou os melhores resultados em termos de maior produção de raminose, índice de emulsificação, crescimento celular e menor tensão superficial.

As Equações 4.1 a 4.4 mostram que entre as variáveis isoladas X_1, X_2 e X_3 o maior efeito foi proporcionado pela variável concentração de nitrato de amônio em todas as respostas analisadas. Mostrando a importância da concentração de nitrato na produção de raminolipídeo.

A Tabela 4.2 mostra que o Experimento 14 foi o que apresentou melhores resultados em relação às seguintes respostas: produção de raminose, tensão superficial e índice de emulsificação. Este resultado era esperado, já que as variáveis respostas analisadas (Equações 4.1 a 4.3) apresentaram os melhores níveis para menores valores de concentração de óleo de soja residual e de nitrato de amônio e para maiores de levedura cervejeira residual.

Vale salientar que no Experimento 16, onde as condições foram idênticas ao do Experimento 14, exceto pela ausência de levedura cervejeira residual, foram obtidos valores menores de raminose e índice de emulsificação, e maior de tensão superficial. Este resultado mostra a importância da adição da levedura residual no meio fermentativo em relação às duas linhagens estudadas. Destaca-se ainda que este é um resíduo da indústria cervejeira, ou seja, de baixo custo e grande disponibilidade, além da quantidade usada ser muito pouca.

Em vista disso, realizou-se um segundo planejamento experimental utilizando as linhagens *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *P. aeruginosa* isolada PALC, com a finalidade de descobrir entre estas duas estirpes a que apresentava maior potencial para a produção de biossurfactante.

4.3. Segundo planejamento fatorial a dois níveis utilizando os microrganismos *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Pseudomonas aeruginosa* isolada PALC

Os resultados obtidos no planejamento fatorial a partir das variáveis estudadas: concentração de óleo de soja residual (OSR), concentração de nitrato de amônio (NA), levedura cervejeira residual (LCR) para as linhagens P. aeruginosa ATCC 9027 e P. aeruginosa PALC, encontram-se na Tabela 4.3. A partir das respostas obtidas para a produção de raminose (RM), tensão superficial (TS), índice de emulsificação (IE) e concentração final de células (Xf), foram construídos os Diagramas de Pareto (Figuras 4.5, 4.6, 4.7 e 4.8).

Tabela 4.3. Resultados médios de produção de raminose, índice de emulsificação, tensão superficial e crescimento celular obtidos durante a realização dos Experimentos

Exp.	OSR (g/L)	NA (g/L)	LCR (g/L)	Microrganismos	RM (g/L)	IE (%)	TS (dina/cm)	X_f (g/L)
1	15	13	10	PALC	0,69	100	27,50	3,55
2	15	13	10	ATCC 9027	0,25	50	34,20	3,21
3	15	13	0	PALC	0,49	70	31,00	2,84
4	15	13	0	ATCC 9027	0,31	68,5	33,30	3,14
5	15	1	10	PALC	1,39	100	26,50	3,14
6	15	1	10	ATCC 9027	0,59	84	31,00	4,59
7	15	1	0	PALC	1,22	100	26,00	3,01
8	15	1	0	ATCC 9027	0,42	76,0	31,60	4,44
9	5	13	10	PALC	0,34	70	31,60	3,84
10	5	13	10	ATCC 9027	0,38	70	32,00	4,33
11	5	13	0	PALC	0,32	62	33,20	3,10
12	5	13	0	ATCC 9027	0,33	62	32,80	4,05
13	5	1	10	PALC	1,19	100	27,00	3,72
14	5	1	10	ATCC 9027	0,77	100	28,00	4,22
15	5	1	0	PALC	0,72	85	28,20	3,57
16	5	1	0	ATCC 9027	0,46	78	31,50	4,10

Experimento ímpar utilizou à cultura isolada *P. aeruginosa* PALC (+1).
Experimento par utilizou à cultura *P. aeruginosa* ATCC 9027 (-1).
Foi adotado o nível +1 para a variável de maior concentração e –1 para a variável de menor concentração.
Tensão superficial inicial do meio de produção 62 dina/cm ± 1 (com 10 g/L de LCR) e 65 dina/cm ± 1 (sem LCR). Concentração de óleo residual (OSR); Concentração de nitrato de amônia (NA);
Concentração de levedura cervejeira residual (LCR); Concentração de raminose (RM);
Índice de emulsão(IE); Tensão superficial (TS); Concentração final de células (X_f)
Concentração inicial (X0) 0,28 e 0,3 ± 0,02g/L células de fase de crescimento exponenciais *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Pseudomonas aeruginosa* isolada PALC, respectivamente.

Na Figura 4.5, verifica-se que as variáveis que influenciaram na síntese da raminose foram X_1 (concentração de óleo), X_2 (concentração de nitrato de amônio), X_3 (concentração de levedura cervejeira residual), X_4 (linhagem microbiana) e as seguintes interações: X_1X_4, X_2X_3 e X_2X_4. Neste planejamento fatorial, para a análise de todas as respostas, os parâmetros com nível de significância maior que 10% em um teste de hipótese utilizando t de Student foram desprezados.

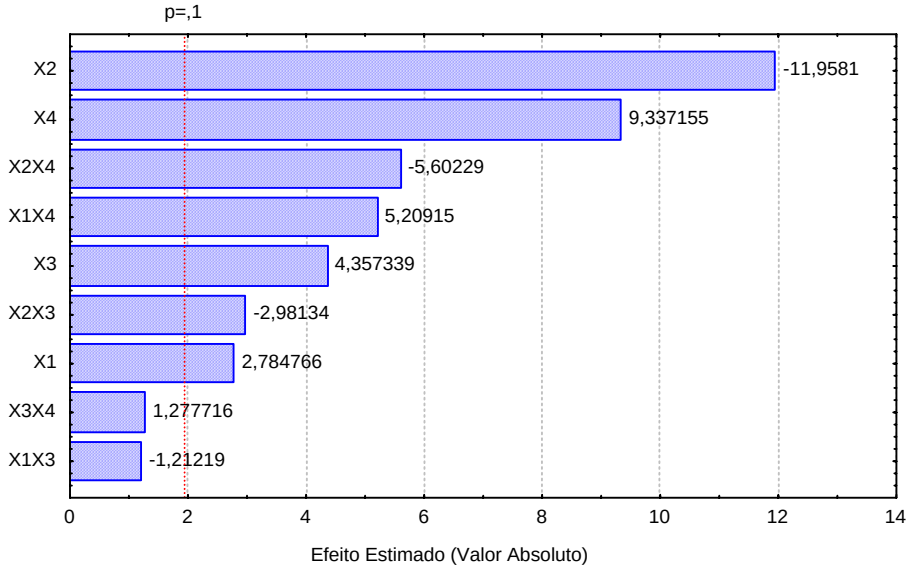


Figura 4.5. Diagrama de Pareto mostrando a contribuição das variáveis estudadas para a produção de raminose.

Nota-se, na Figura 4.5, que a variável que mais influenciou no aumento da concentração de raminose foi X_2. O sinal negativo desta variável significa que menores concentrações de nitrato de amônio promovem maiores produções de raminose, como pode ser comprovado analisando comparativamente os Experimentos 1 e 5; 2 e 6; 3 e 7; 4 e 8; 9 e 13; 10 e 14; 11 e 15; 12 e 16. O sinal positivo referente à variável X_4 significa que esta variável quando passa de um nível -1 (ATCC 9027) para o nível +1 (PALC) tem a resposta raminose aumentada.

Sabendo-se que a variável X_4 é uma variável qualitativa e a equação do modelo empírico deve ser em função das variáveis quantitativas, fez-se necessário a correção da equação ajustada substituindo a variável X_4 pelo valor –1 ou +1 de forma a maximizar as respostas produção de raminose, índice de emulsificação e crescimento celular e minimizar a tensão superficial. Este procedimento foi adotado para as demais equações ajustadas para as respostas tensão superficial, índice de emulsificação e crescimento

celular. Sendo assim, a equação estimada para a resposta síntese de raminose encontra-se em função da variável correção X_1, X_2 e X_3 representadas na Equação 4.5.

$$\text{Raminose} = 0{,}795 + 0{,}153X_1 - 0{,}335X_2 + 0{,}083X_3 - 0{,}057X2X3 \qquad (4.5)$$

O valor obtido para o quadrado do coeficiente de determinação dessa equação foi de 0,97, o que significa dizer que 97,0% da variabilidade dos dados produção de raminose foram explicados pela Equação 4.5. Os sinais positivos das variáveis X1 e X3 mostram que maiores concentrações de óleo de soja residual e de levedura cervejeira residual promovem maiores produções de raminose (vide Experimentos 1 e 11; 5 e 15).

A Figura 4.6 mostra que as variáveis X2, X3, X4 e a interação X1X4 foram as que influenciaram a tensão superficial, sendo a variável X_2 a de maior relevância. O sinal desta variável significa que menores concentrações de nitrato de amônio levam a valores mais baixos de tensão superficial. O sinal negativo referente à variável X_4 significa que quando esta variável passa de um nível -1 (ATCC 9027) para o nível +1 (PALC) a resposta tensão superficial é diminuída.

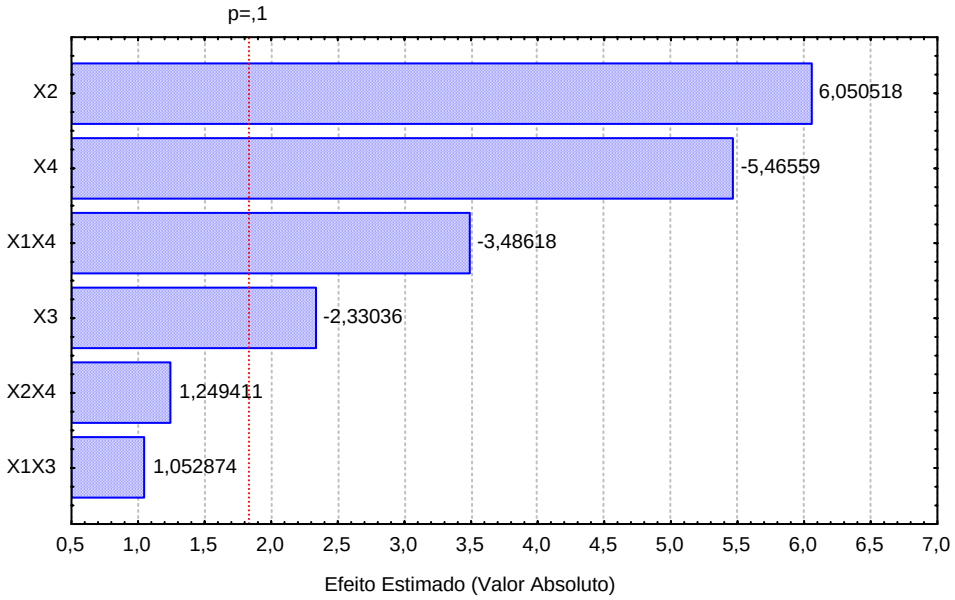


Figura 4.6. Diagrama de Pareto mostrando a contribuição das variáveis estudadas na redução da tensão superficial.

A Equação 4.6 apresenta a resposta ajustada para a tensão superficial em função da variável correção X_1, X_2, e X_3.

$$\text{Tensão superficial} = 28{,}888 - 0{,}931X_1 + 1{,}616X_2 - 0{,}622X_3 \qquad (4.6)$$

O R^2 mostra que 88% da variabilidade dos dados de redução da tensão superficial foram explicados pela Equação 4.6.

De acordo com a Figura 4.7, verifica-se que as variáveis que influenciaram no índice de emulsão foram X_2, X_3, X_4 e X_1X_4.

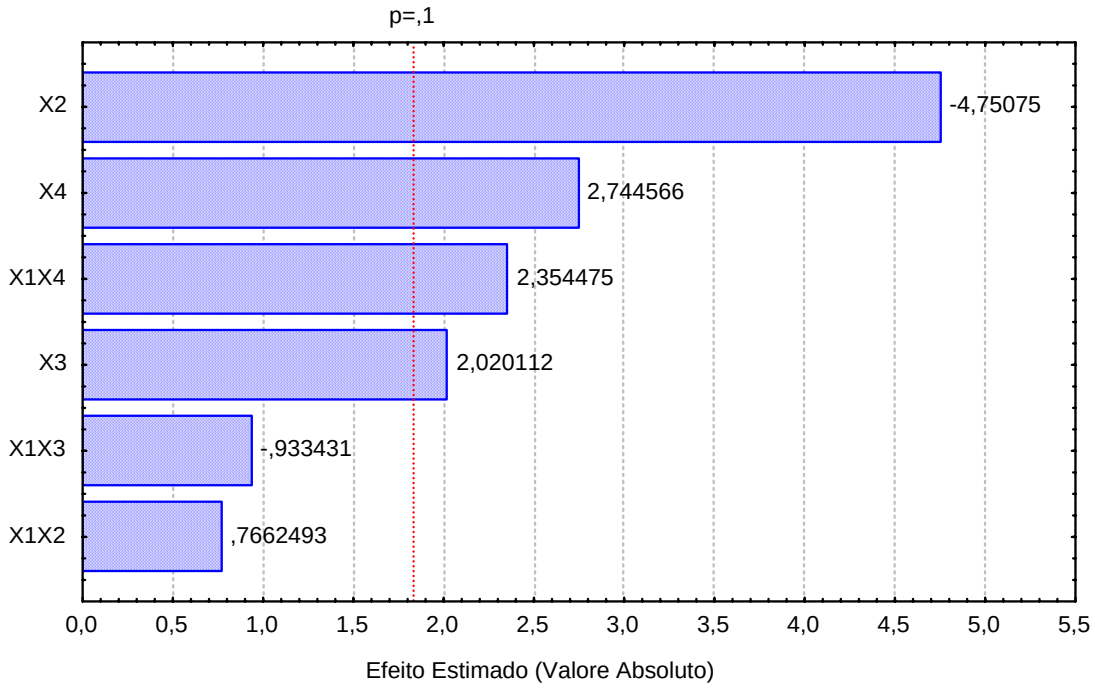


Figura 4.7. Diagrama de Pareto mostrando a contribuição das variáveis estudadas para o índice de emulsificação.

Verifica-se, na Figura 4.7, que a variável que mais influenciou no aumento do índice de emulsificação foi X_2. O sinal desta variável mostra que menores valores na concentração de nitrato de amônio promovem maiores resultados no índice de emulsificação (Experimentos 2 e 6; 3 e 7; 4 e 8; 9 e 13; 10 e 14; 11 e 15; 12 e 16).

O sinal positivo referente à variável X_4 significa que esta variável quando passa de um nível -1 (ATCC9027) para o nível +1 (PALC) aumenta a resposta índice de emulsificação. A Equação 4.7 ajustada para a resposta índice de emulsificação pode ser descrita como função da variável correção X_1, X_2 e X_3.

$$\text{Índice de emulsificação} = 85{,}875 + 5{,}281X_1 - 10{,}656X_2 + 4{,}531X_3 \qquad (4.7)$$

O valor do quadrado do coeficiente de determinação indica que 79% dos dados experimentais podem ser explicados pela Equação 4.7. Os sinais positivos das variáveis X_1 e X_3 mostram que aumentos das concentrações de óleo de soja residual e de levedura

cervejeira residual resultam em aumentos no índice de emulsificação (1 e 11; 2 e 12; 5 e 15; 6 e 16)

Conforme observado na Figura 4.8 as variáveis que influenciaram no crescimento celular foram X_3, X_4 e as interações X_1X_2, X_1X_4, X_2X_4 e X3X4. Observa-se, pelos valores dos parâmetros e dos níveis de significância, que a variável que mais influenciou no aumento do crescimento foi a linhagem de *Pseudomonas*. O sinal negativo referente à X_4 significa que quando esta variável quando passa de um nível –1 (ATCC9027) para o nível +1 (PALC) a resposta (crescimento celular) é reduzida.

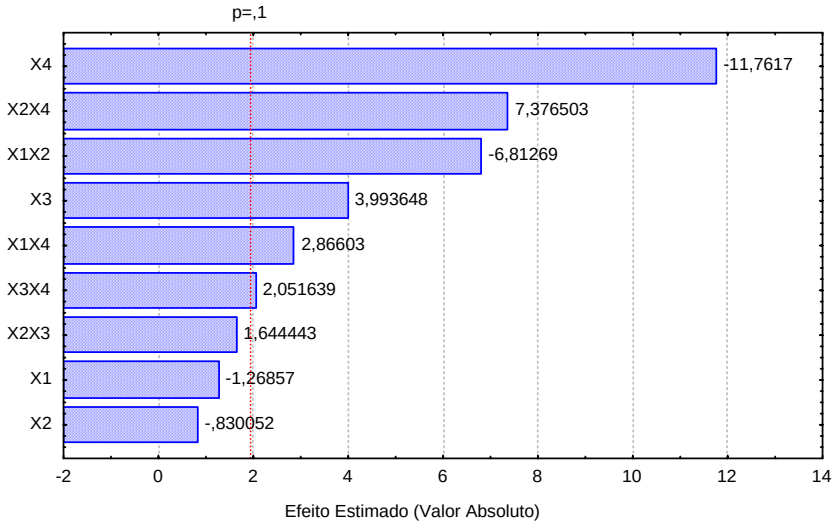


Figura 4.8. Diagrama de Pareto mostrando a contribuição das variáveis estudadas para o crescimento celular.

A Equação 4.8, ajustada para a resposta crescimento celular, foi representada por:

$$\text{Crescimento celular} = 4{,}012 - 0{,}114X_1 - 0{,}293X_2 + 0{,}078X_3 - 0{,}272X_1X_2 \qquad (4.8)$$

O R^2 de 0,96 mostra que 96% dos dados de crescimento celular foram explicados pela Equação 4.8. Os sinais de X_1 e X_2 mostram que menores concentrações de óleo de soja residual e de nitrato de amônio induz a maiores produções de biomassa.

As Figuras 4.5, 4.6 e 4.7 e as Equações 4.5, 4.6 e 4.7 mostram que a concentração de nitrato de amônio foi a variável de maior efeito nas respostas: síntese de raminose, tensão superficial e índice de emulsificação. Este fato mostra a importância da concentração de nitrogênio neste processo fermentativo. Este resultado sugere que após otimizar a concentração dessa variável outro fator interessante de ser avaliado é a influência da fonte de nitrogênio a ser empregada.

Conforme os valores obtidos na Tabela 4.3, verifica-se que as duas estirpes possuem um bom potencial para a produção de biossurfactante, pois todos os valores obtidos na redução da tensão superficial foram inferiores a 35 dina/cm. Sendo que a percentagem de redução da tensão superficial máxima foi de 60% no Experimento 7.

Segundo COOPER (1984), um organismo é considerado promissor produtor de biossurfactante quando produz compostos tensoativos com tensão superficial inferior a 40 dina/cm. Todavia, para um biossurfactante ser considerado eficiente é necessário que este valor esteja abaixo de 35 dina/cm.

Apesar da linhagem *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 apresentar maior crescimento celular, ela não apresentou melhores resultados em relação à produção de raminose (RM), tensão superficial (TS) e ao índice de emulsificação (IE), conforme mostram os resultados apresentados nas Figuras 4.5, 4.6 e 4.7 e Equações 4.5, 4.6 e 4.7 e na Tabela 4.3. Nesta Tabela verifica-se, pelos Experimentos 1, 3, 5, 7, 13 e 15 em relação aos 2, 4, 6, 8, 14 e 16, que a linhagem isolada (PALC) foi a que apresentou melhores resultados. Comparando as duas linhagens, nos Experimentos 9 e 11 com os Experimentos 10 e 12, pode-se observar resultados similares para RM, IE e TS , embora o crescimento de *Pseudomonas* ATCC 9027 tenha sido maior. Isto indica que esta linhagem utilizou uma maior parte do substrato para síntese de componentes celulares em detrimento da síntese do biossurfactante.

Analisando os experimentos impares (linhagem isolada) em comparação com os pares (linhagem ATCC), isto é, Experimentos 9 e 1, 11 e 3, 13 e 5 e 15 e 7, quando houve aumento da concentração de óleo de soja residual, pode-se verificar aumentos da concentração de raminose e do índice de emulsificação e o decréscimo da tensão superficial para ambas. Este comportamento está de acordo com a análise das Equações 4.5, 4.6 e 4.7 e com os gráficos de Pareto (Figuras 4.5, 4.6 e 4.7). Entre os pares de experimentos mencionados anteriormente, o que apresentou maior variação nas respostas estudadas foi o 1 e 9 (aumento de 102,9% na produção de raminose e 42,9% no índice de emulsificação e redução de 13% na tensão superficial), justamente quando foram empregados as maiores concentrações de nitrato de amônio e de levedura cervejeira residual. Estes fatos mostram a necessidade de se estudar uma faixa mais ampla de concentração de óleo de soja residual, visando a otimização desta variável no processo de produção de raminolipídeo.

Comparando os Experimentos 3 e 1; 7 e 5; 9 e 11; e 15 e 13, verificou-se que aumentando a concentração de levedura cervejeira residual ocorreu um aumento na

concentração de raminose, no índice de emulsificação e uma redução na tensão superficial. Este comportamento está de acordo com a análise das Equações 4.5, 4.6 e 4.7 e com os gráficos de Pareto (Figuras 4.5, 4.6 e 4.7). O par de ensaios em que se obteve uma das maiores variações na porcentagem de raminose produzida, no índice de emulsificação e na tensão superficial foi 3 e 1, que também são os Experimentos realizados com as máximas concentrações de óleo de soja residual e nitrato de amônio. Estes resultados apontam para a necessidade de ampliar a faixa de concentração de levedura cervejeira residual, objetivando a otimização desta variável no processo de produção de raminolipídeo.

O Experimento 5, para o qual obteve-se maior produção de raminose (1,39 g/L), redução na tensão superficial do meio de 57,3% e índice de emulsificação de 100%, foi conduzido com as concentrações máximas de óleo de soja residual e de levedura cervejeira residual e menor de nitrato de amônio. Por outro lado, no Experimento 11, onde as concentrações de óleo de soja residual e levedura de cervejaria residual foram mínimas e a de nitrato de amônio foi máxima, foram obtidos os piores resultados. Este comportamento não só corrobora o que foi acima mencinado, mas também embasa a necessidade de otimizar a concentração de nitrato de amônio.

Os resultados da Tabela 4.3 mostram que valores superiores a 0,69 g/L de raminose não tem efeito significativo na redução da tensão superficial. Isto provavelmente ocorre por ser alcançada a concentração micelar crítica. Por outro lado, os resultados mostram que mostos com valores de tensão semelhantes (Experimentos 14 e 15; e 3 e 6) podem apresentar diferentes índices de emulsificação. Isto demonstra que não existe uma relação direta entre a redução da tensão superficial e a propriedade emulsificante. Resultados semelhantes foram obtidos por Kosaric (1996) e Wilumsen & Karlon (1997). De fato, esta propriedade está relacionada com a estrutura da molécula, que por sua vez é afetada pelas condições nutricionais e ambientais.

Os resultados obtidos neste planejamento sugerem que a linhagem isolada (PALC) apresenta, além de melhor capacidade degradativa do óleo de soja residual, maior potencial para produzir biossurfactante, tendo, por isso, sido selecionada para continuidade dos Experimentos. Assim foi dado prosseguimento ao estudo, realizando outro planejamento experimental composto central, adotando uma faixa mais ampla de concentração de óleo de soja residual, de 1,4 a 42,6 g/L, enquanto os valores testados de concentração de levedura cervejeira residual e de nitrato de amônio foram de 0,56 a 22,5 g/L e de 0 a 11,25 g/L, respectivamente.

4.4. Resultados do planejamento composto central (PCC)

Os resultados obtidos no planejamento composto central (PCC) a partir das variáveis estudadas: concentração de óleo de soja residual (OSR), concentração de nitrato de amônio (NA) e levedura cervejeira residual (LCR) empregando a linhagem isolada *Pseudomonas aeruginosa* PALC, encontram-se na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Resultados médios de produção de raminose, índice de emulsificação, tensão superficial e crescimento celular obtidos durante a realização dos experimentos empregando a cultura isolada PALC

Experimentos	OSR (g/L)	NA (g/L)	LCR (g/L)	Raminose (g/L)	Tensão Superficial (dina/cm)	Índice Emulsão (%)	pH	X_f (g/L)
1	6	1,25	3	0,59	30,5	88	6,55	2,26
2	6	1,25	20	0,50	31,0	84	6,54	2,283
3	6	10	3	0,40	32,0	64	4,56	3,105
4	6	10	20	0,43	31,5	74	5,43	3,351
5	38	1,25	3	0,35	32,5	84	6,36	2,49
6	38	1,25	20	0,32	32,5	79	6,34	3,332
7	38	10	3	0,31	31,9	77	4,30	3,47
8	38	10	20	0,27	32,1	68	4,21	3,435
9	1,4	5,625	11,5	0,96	27,7	86	6,25	3,381
10	42,6	5,625	11,5	1,63	26,4	95	6,32	3,687
11	22	0	11,5	0,78	28,6	90	6,51	2,69
12	22	11,25	11,5	1,34	27,0	87	7,5	3,943
13	22	5,625	0,56	1,15	27,1	94	6,45	3,732
14	22	5,625	22,5	1,31	26,6	96	6,32	3,726
15 (C)	22	5,625	11,5	2,20	25,7	100	6,23	4,213
16 (C)	22	5,625	11,5	2,30	25,6	100	6,30	4,79

Concentração de óleo residual (OSR); Concentração de nitrato de amônia (NA); Concentração de levedura cervejeira residual (LCR);
Concentração inicial (X_0) 0,3 ± 0,02g/L células da cultura *P. aeruginosa* PALC

Analisando a Tabela 4.4 verifica-se que os melhores resultados, de todas as respostas avaliadas, foram obtidos nos experimentos localizados no ponto central (Experimentos 15 e 16).

Comparando o ensaio 9 com o 15 ou 16, realizados com a menor e maior concentração de óleo de soja residual (OSR), 1,4 e 22 g/L, respectivamente, e iguais concentrações de nitrato de amônio (5,625 g/L) e levedura cervejeira residual (11,5 g/L), fica evidente que a produção de raminose foi diretamente proporcional ao aumento de OSR, tendo sido alcançado valor máximo de 2,3 g/L em 48 h.

Este comportamento já foi relatado por alguns autores (OSCHNER & REISER, 1995, LANG & WULLBRANDT, 1999) que demonstraram a importância de realizar bioprocessos com altas concentrações da fonte de carbono para a obtenção de elevadas concentrações de biossurfactantes por *Pseudomonas* sp. Marcadé *et al*. (1993) obtiveram uma concentração máxima de 1,4 g/L de raminolipídeo em 150 horas de fermentação, utilizando como fonte de carbono 10% (p/v) de resíduo de óleo de milho. Santa Anna *et al*. (2001) e Santos *et al.* (2002) investigando a influencia de distintas fontes de carbono (n-hexadecano, etanol, glicerol, óleo de babaçu e óleo de soja) na produção de raminolipídeos com uma linhagem, *Pseudomonas aeruginosa* PA1, isolada de ambiente de petróleo. Os autores selecionaram o glicerol como melhor fonte de carbono obtendo a maior quantidade de raminolipídeos (7,4 g/L). Rahman *et al*. (2000) também empregaram óleo de fritura como substrato para o cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129, obtendo 4,3 g/L de raminolipídeo após 288 horas de fermentação. Em contrapartida, Abalos *et al.* (2001) obtiveram 2 g/L e 9,6 g/L de raminolipídeo respectivamente após 48 e 96 horas, para o cultivo de *P. aeruginosa* AT10 a partir de 5% óleo de soja.

4.4.1. Análise de regressão dos resultados obtidos na produção de raminose a partir das variáveis estudadas

Após a realização da regressão múltipla no programa *Statistic 5.1,* obteve-se a seguinte equação geral (4.9) para a síntese da raminose (R):

$$R = 2{,}218 + 0{,}017X_1 + 0{,}033X_2 + 0{,}008X_3 - 0{,}550X_1^2 - 0{,}691X_2^2 - 0{,}589X_3^2 + 0{,}021X_1X_2 - 0{,}002X_1X_3 + 0{,}013X_2X_3 \quad (4.9)$$

Contudo, foram eliminadas as variáveis com nível de significância superior a 10%. Assim foram desprezadas as variáveis lineares X_1 (OSR), X_2 (NA), X_3 (LCR) e as interações X_1X_2, X_1X_3 e X_2X_3.

A Tabela 4.5 apresenta os resultados obtidos dos efeitos significativos das variáveis estuda, juntamente com o coeficiente de determinação (R^2) e o valor de F da distribuição de Fisher como resposta à produção de raminose.

Tabela 4.5. Resultados da regressão para a produção de raminose

Fator Codificado	Símbolos	Parâmetro	t de student	Nível de significância
Constante β_0	β_0	2,218	19,074	0,0
X1X1	$(OSR)^2$	- 0,550	- 6,418	$3,3.10^{-5}$
X2X2	$(NA)^2$	- 0,691	- 8,8,064	$3,0.10^{-6}$
X3X3	$(LCR)^2$	-0,589	- 6,870	$1,7.10^{-5}$
R^2= 0,92		F_c = 51,14		F_t (0,01) = 5,95

Constata-se, na Tabela 4.5, que as variáveis isoladas não influenciaram significativamente o processo, apenas suas interações quadráticas. Os sinais dos coeficientes dessas variáveis indicam um ponto de máximo na produção de raminose.

Os resultados apresentados na Tabela 4.4 mostram que a síntese de raminose foi máxima nos ensaios 15 e 16 em que as concentrações das variáveis estudadas estão no ponto central. Isto indica que o ponto de máximo na otimização dessa variável foi próximo às condições centrais do planejamento. Vale ressaltar que os melhores resultados encontrados para o índice de emulsão, concentração de biomassa e tensão superficial estão localizados no ponto central do planejamento (Experimentos 15 e 16).

Em geral, os meios de produção apresentaram poder tamponante, visto que o pH final manteve-se na faixa de 6,25 a 7,5. Esta condição é adequada para a atividade da bactéria em estudo.

Percebe-se também que o aumento da síntese de raminose nos Experimentos testados promoveu um aumento do índice de emulsão nos mesmos, demonstrando que as condições propiciaram a síntese de biossurfactante com propriedade emulsificante.

A equação empírica ajustada que representa a síntese de raminose esta descrita na Equação 4.10.

$$\text{Raminose} = 2,218 - 0,55X_1X_1 - 0,691X_2X_2 - 0,589X_3X_3 \qquad (4.10)$$

O resultado de F calculado (Fc) foi superior ao F tabelado (F_T) para um nível de significância de 1%, podendo rejeitar H_0 no nível de significância de 1%. Portanto, tem-se 99% de confiança de que o modelo é significativo. Esta análise será extrapolada para as demais respostas analisadas.

O coeficiente de determinação (R^2) de 0,92, indica um ajuste adequado dos dados experimentais para a resposta síntese de raminose, frente à equação empírica proposta, ou seja, 92% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação do modelo ajustado.

A Figura 4.9 mostra a distribuição dos resíduos em torno de zero e a Figura 4.10, o gráfico de valores predito em função dos observados. Observa-se que a distribuição dos resíduos foi aleatória em torno de zero, sem nenhuma tendência e os valores observados ficaram próximos dos preditos, levando a uma tendência, constante e à distribuição normal dos mesmos.

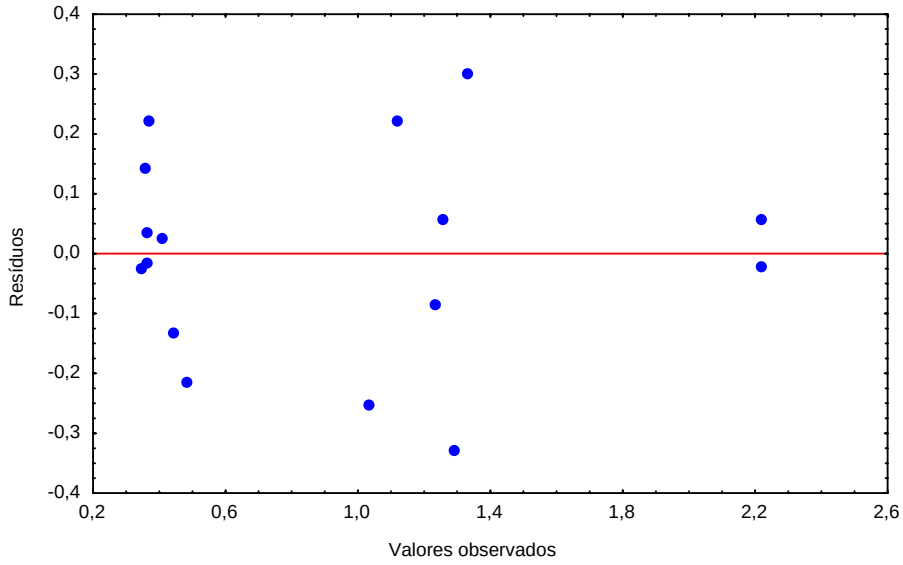


Figura 4.9. Distribuição dos resíduos relativos à síntese de raminose.

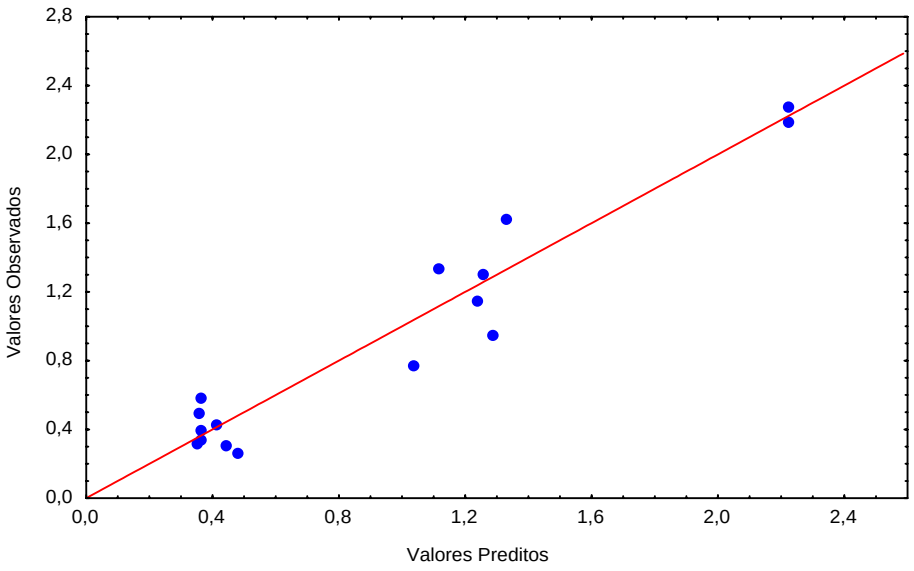


Figura 4.10. Valores preditos em função dos observados relativos à síntese de raminose.

A partir da equação completa (4.9) foi utilizado um algoritmo feito no programa Maple VIII release 4 para calcular o ponto estacionário para a síntese de raminose. Os valores de λ's referentes à síntese de raminose indicaram que esta resposta possui um ponto de máximo, pois λ_1 = -0,6919, λ_2 = -0,5875 e λ_3 = -0,5482 apresentaram sinais iguais e negativos.

As coordenadas x_1 = 0,0154, x_2 = 0,02389 e x_3 = 0,0071, representam os valores codificados que maximizam a resposta.

Utilizando as equações de codificação (3.2), (3.3) e (3.4), obtêm-se os valores reais das concentrações das variáveis no ponto de maximização da síntese da raminose.

X_1= 22,246 g/L de óleo de soja residual;

X_2 = 5,729 g/L de nitrato de amônio;

X_3 = 11,560 g/L de levedura cervejeira residual.

A partir dos valores codificados das variáveis X_1, X_2 e X_3 no ponto de otimização, determinou-se que a concentração da síntese de raminose neste ponto foi de 2,218 g/L. Como era esperada, a condição de otimização é próxima a das empregadas nos Experimentos 15 e 16.

Para visualizar com maior facilidade o efeito das variáveis independentes (concentrações de óleo de soja residual, nitrato de amônio e levedura cervejeira residual) sobre a síntese de raminose, foram construídas as superfícies de resposta, Figuras 4.11, 4.13 e 4.15, bem como as respectivas curvas de contorno, Figuras 4.12, 4.14 e 4.16.

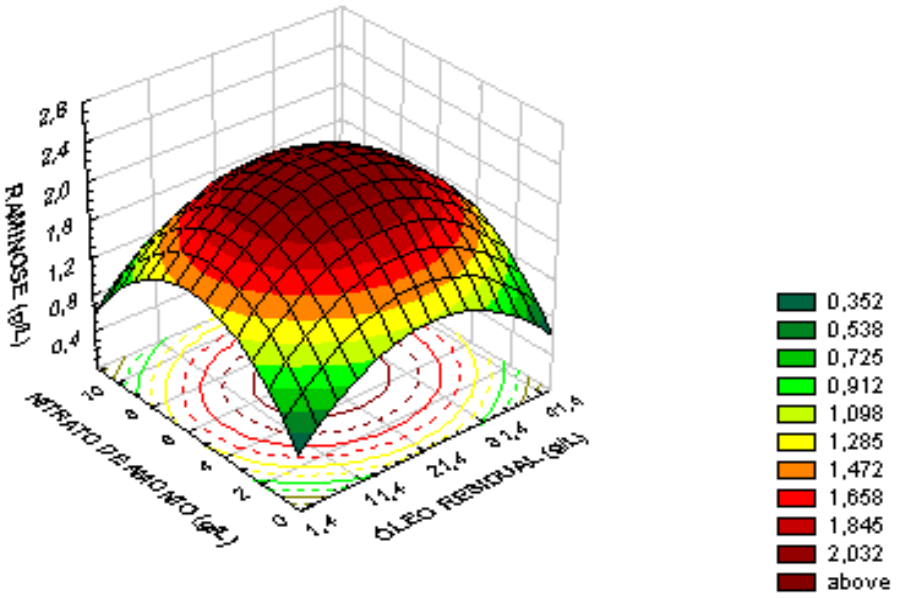


Figura 4.11. Superfície de resposta para a síntese de raminose em função da concentração de óleo de soja residual e nitrato de amônio.

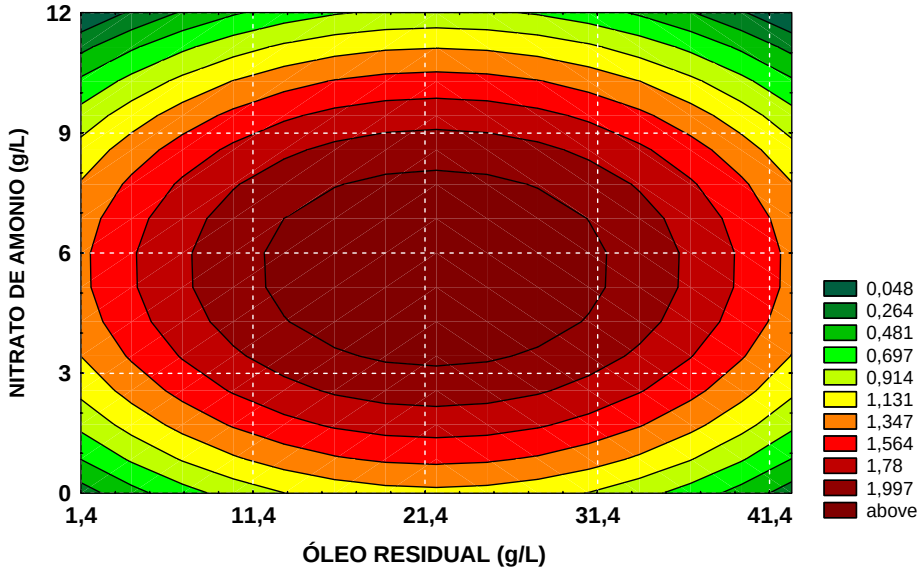


Figura 4.12. Curvas de contorno para a resposta raminose em função da concentração de óleo de soja residual e nitrato de amônio.

Analisando a superfície de resposta, Figura 4.11, e as curvas de contorno, Figura 4.12, observa-se que a faixa ótima para obtenção dos melhores resultados para raminose está entre 12,4 a 31,4 g/L de óleo de soja residual e 3,4 a 8,0 g/L de nitrato de amônio.

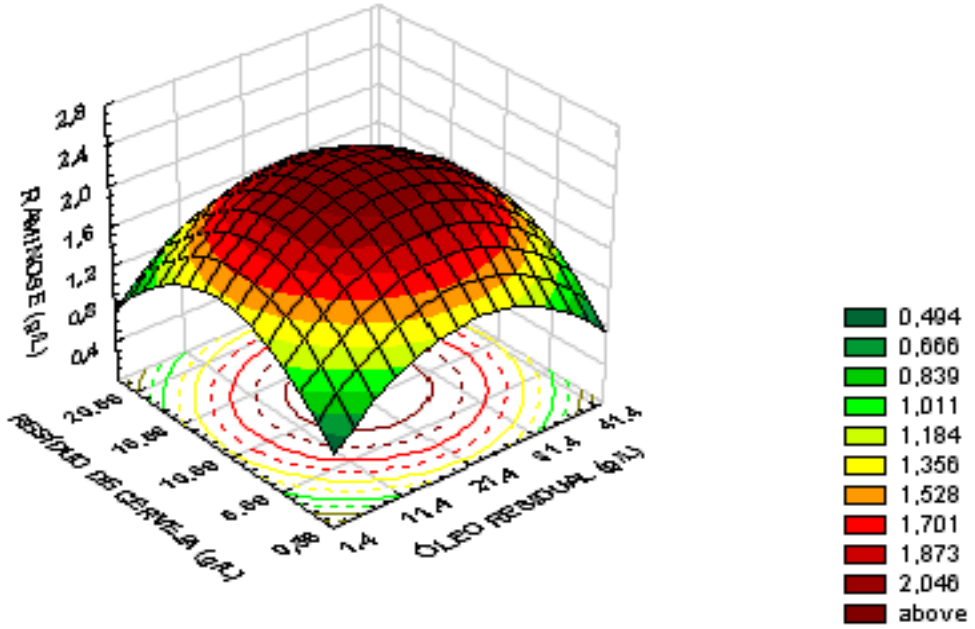


Figura 4.13. Superfície de resposta para a síntese de raminose em função da concentração de óleo de soja residual e levedura cervejeira residual.

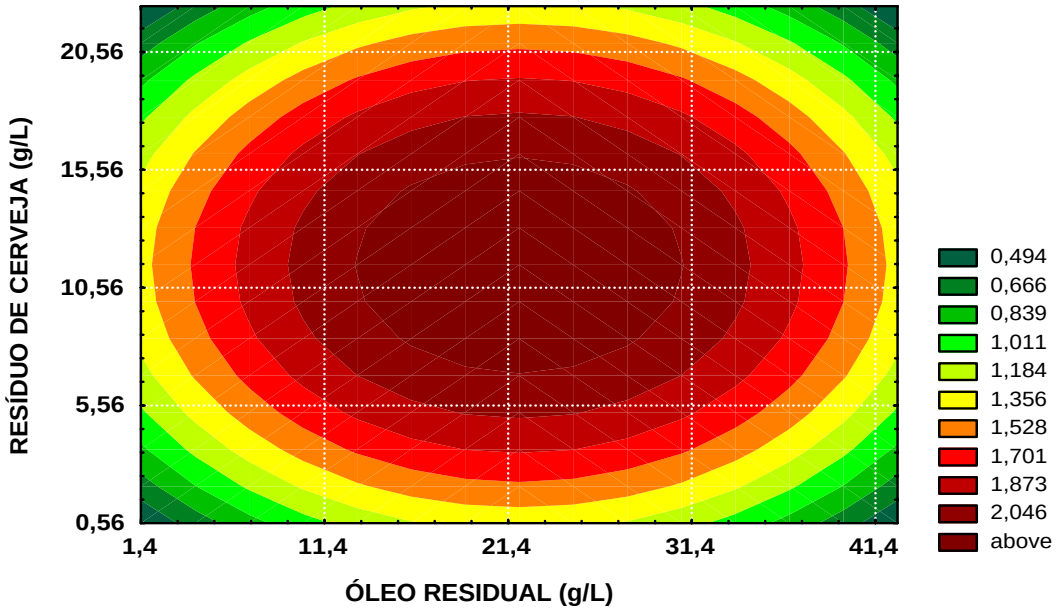


Figura 4.14. Curva de contorno para a reposta raminose em função da concentração de óleo de soja residual e resíduo de cerveja.

Através da superfície de resposta (Figura 4.13) gerada pela equação do modelo ajustado (4.10), conclui-se que o valor máximo de raminose encontra-se em uma região próxima ao ponto central. Quanto às curvas de contorno, Figura 4.14, a faixa ótima para a concentração de óleo de soja residual encontra-se entre 13,4 a 31,4 g/L e para a concentração de resíduo de cerveja entre 6,5 a 15,7 g/L.

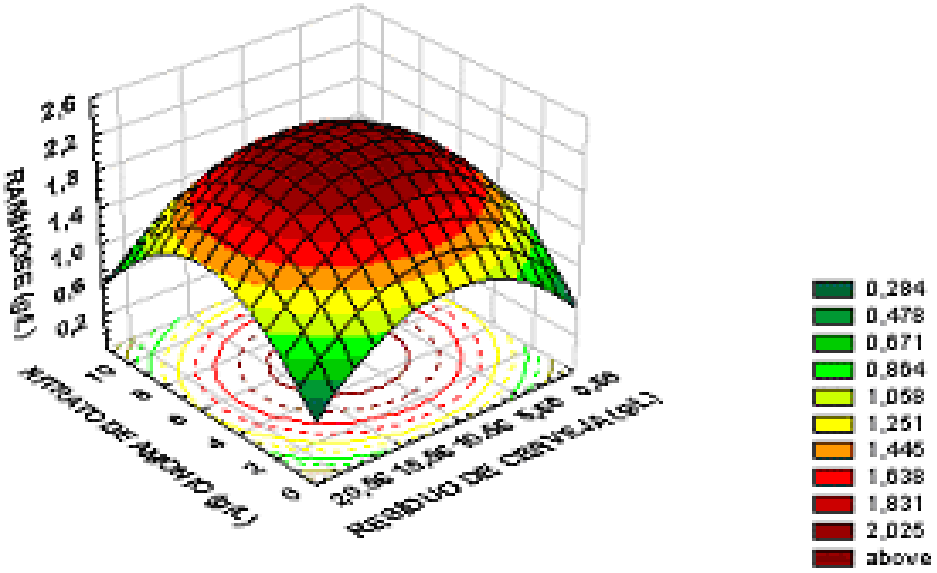


Figura 4.15. Superfície de resposta para a síntese de raminose em função da concentração de nitrato de amônio e levedura cervejeira residual.

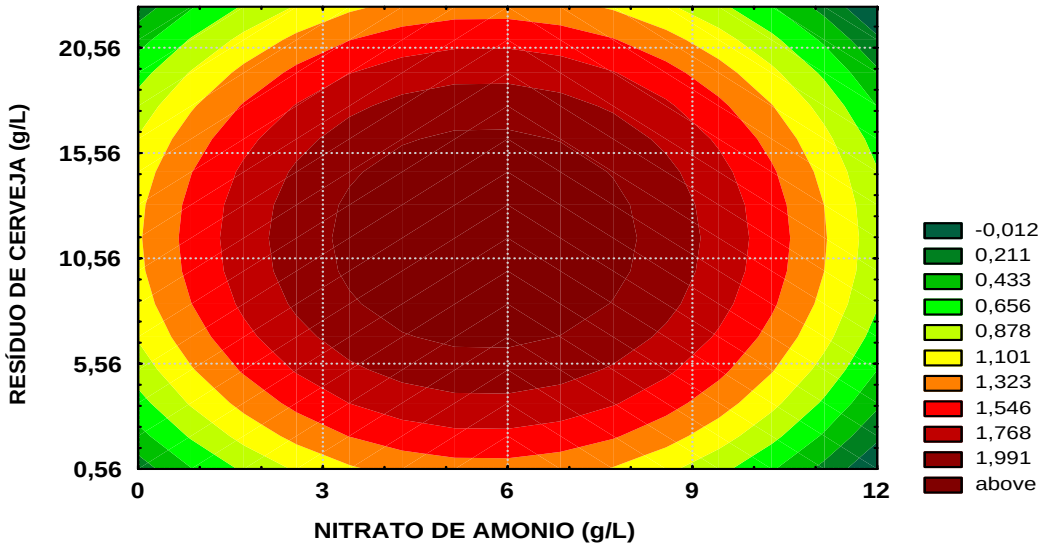


Figura 4.16. Curva de contorno para a resposta raminose em função da concentração de nitrato de amônio e levedura cervejeira residual.

Constata-se nas Figuras 4.15 e 4.16 que a região de maior produção de raminose está localizada próximo ao ponto central e a faixa ótima para se trabalhar no processo fermentativo encontra-se entre 3,4 a 7,9 g/L de nitrato de amônio e 6,86 a 16,46 g/L de levedura cervejeira residual.

4.4.2. Análise de regressão dos resultados obtidos da tensão superficial a partir das variáveis estudadas

A equação geral do modelo que representa os índices de tensão superficial em função das variáveis estudadas (óleo de soja residual, nitrato de amônio e levedura cervejeira residual) foi definida como (Equação 4.11):

$$\text{Tensão superficial} = 24{,}377 + 0197X_1 - 0{,}096X_2 - 0{,}035X_3 + 2{,}2100X_1^2 + 2{,}662X_2^2 + 2{,}097X_3^2 - 0{,}375X_1X_2 + 0{,}031X_1X_3 - 0{,}094X_2X_3 \quad (4.11)$$

Na Tabela 4.6 apresentam-se os resultados obtidos dos efeitos significativos das variáveis estudadas, o coeficiente de determinação (R^2) e o valor de F da distribuição de Fisher como resposta à redução da tensão superficial.

Tabela 4.6. Resultados da regressão para a tensão superficial

Fator Codificado	Símbolos	Parâmetro	t de student	Nível de significância
Constante	β_0	24,3769	36,0061	1,35E-13
X1X1	$(OSR)^2$	2,2098	4,4312	0,0009
X2X2	$(NA)^2$	2,6624	5,3390	0,0001
X3X3	$(LCR)^2$	2,0966	4,2043	0,0012
R^2= 0,84		F_C= 51,14	F_T (0,01) = 5,95	

A Equação 4.12 apresenta o modelo ajustado para a tensão superficial.

$$\text{Tensão superficial} = 24{,}3769 + 2{,}2098\ X_1^2 + 2{,}6624\ X_2^2 + 2{,}0966\ X_3^2 \quad (4.12)$$

Nota-se, através da Equação ajustada 4.12, que as variáveis isoladas não foram significativas, influenciando apenas suas interações quadráticas.

Nos Experimentos 1 ao 8 (Tabela 4.4), nota-se que a alteração nas concentrações de óleo de soja residual, nitrato de amônio e levedura cervejeira residual, não promoveram uma mudança significativa na tensão superficial do meio. Em contrapartida, com as concentrações de óleo de soja residual e nitrato de amônio e levedura cervejeira residual em torno de 22, 5,625 e 11,5 g/L, respectivamente, obteve-se os menores valores para a tensão superficial, demonstrando que estas concentrações estão dentro da região de otimização do processo.

A Figura 4.17 mostra a distribuição dos resíduos em torno de zero e a Figura 4.18, o gráfico de valores preditos em função dos observados. Observa-se que a distribuição dos resíduos foi aleatória em torno de zero, sem nenhuma tendência e os valores observados ficaram próximos dos preditos, levando a uma tendência constante e à distribuição normal dos mesmos.

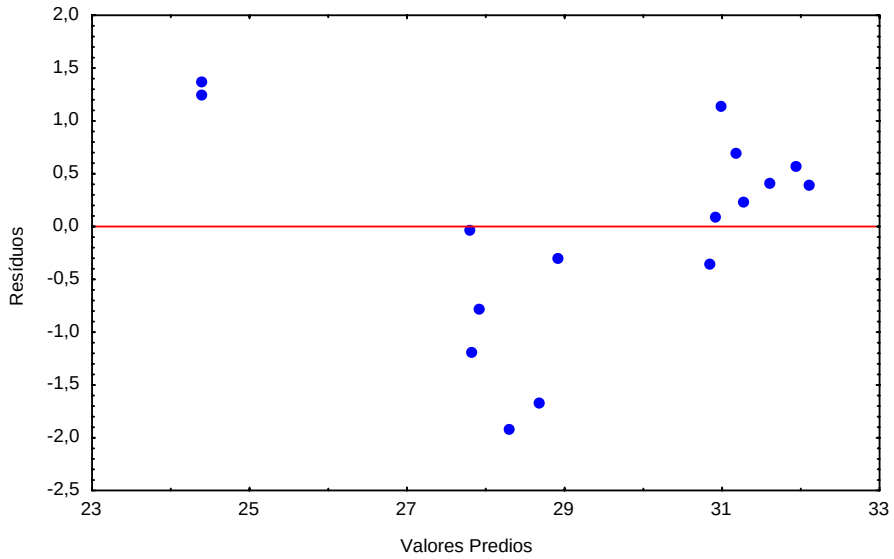


Figura 4.17. Distribuição dos resíduos relativos à tensão superficial.

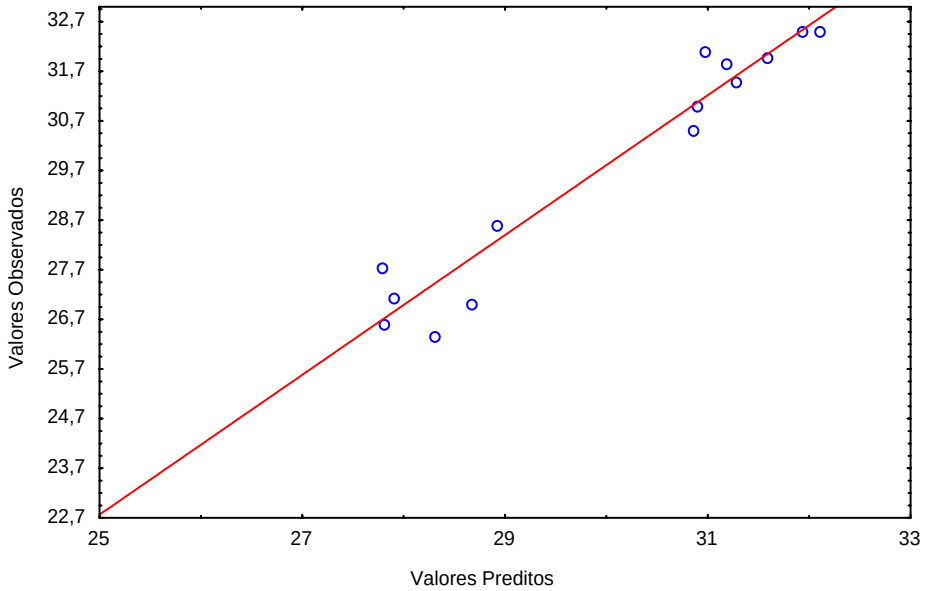


Figura 4.18. Valores preditos em função dos observados relativos à tensão superficial.

A partir do modelo completo (4.11) foi utilizado um algoritmo feito no programa Maple VIII release 4 para calcular o ponto estacionário para à tensão superficial. O λ's referentes à tensão superficial indicaram que esta resposta possui

ponto de mínimo, pois λ_1 = 2,092 λ_2 = 2,141 e λ_3 = 2,733 apresentam sinais iguais e positivos.

As coordenadas x_1 = -0,0433, x_2 = 0,0152 e x_3 = 0,0089 representam os valores codificados que minimizam a resposta.

Utilizando as equações de codificação (3.2), (3.3) e (3.4), obtêm-se os valores reais das concentrações das variáveis no ponto de minimização da tensão superficial.

X_1= 21,307 g/L de óleo de soja residual;

X_2 = 5,691 g/L de nitrato de amônio;

X_3 = 11,575 g/L de levedura cervejeira residual.

A partir dos valores codificados das variáveis x_1, x_2 e x_3 no ponto de mínimo, determinou-se que a tensão superficial neste ponto foi de 24,372 dina/cm. Como era esperado, este valor está bem próximo ao obtido nos Experimentos 15 e 16 (25,75 e 25,625, respectivamente), pois as variáveis do ponto de minimização estão próximas ao central.

Com o intuito de obter uma melhor visualização do efeito das variáveis independentes sobre a tensão superficial foram construídas superfícies de resposta juntamente com as curvas de contorno. As superfícies estão apresentadas nas Figuras 4.19, 4. 21 e 4.23 e as curvas pelas Figuras 4.20, 4.22 e 4.24.

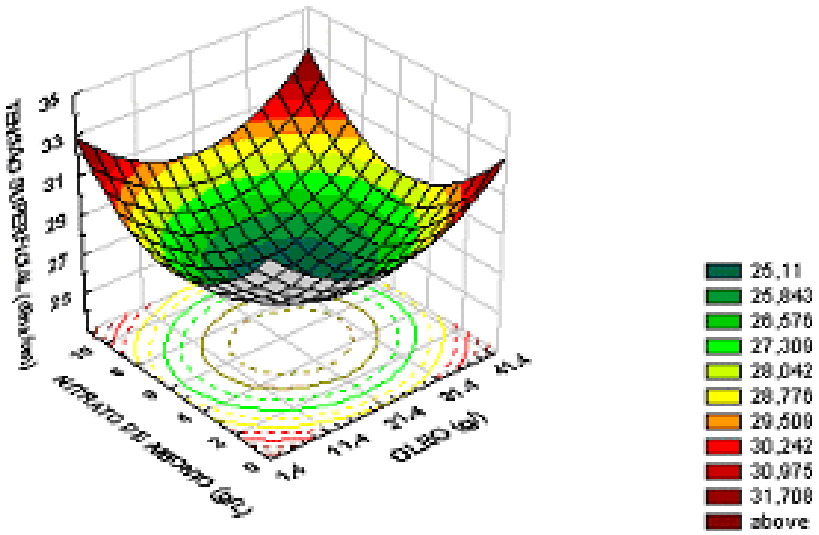


Figura 4.19. Superfície de resposta para a tensão superficial em função da concentração de óleo de soja residual e nitrato de amônio.

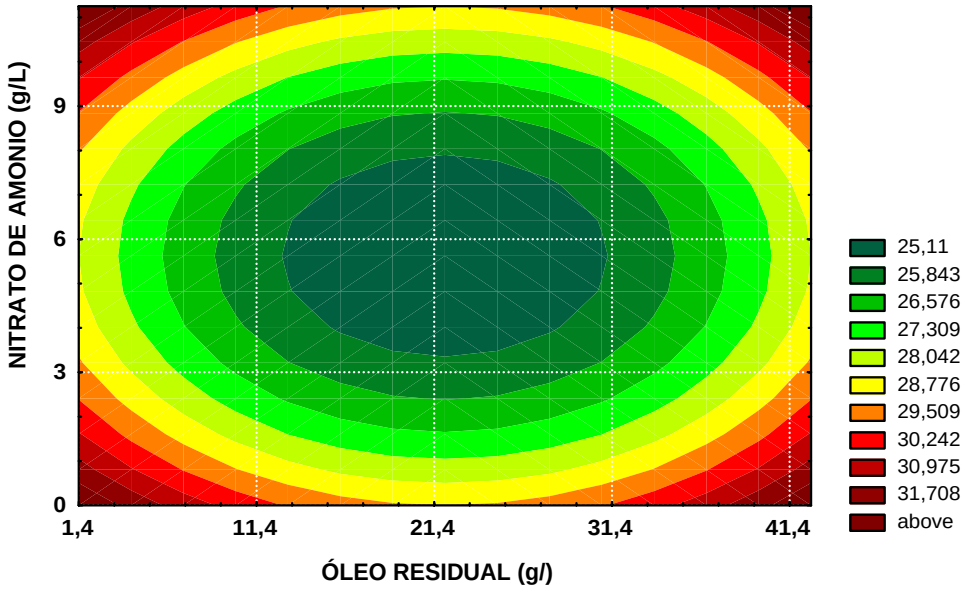


Figura 4.20. Curva de contorno para a resposta tensão superficial em função da concentração de óleo de soja residual e nitrato de amônio.

Pelas análises das superfícies de respostas e curvas de contorno (Figuras 4.19 e 4.20, respectivamente), verifica-se que para minimizar a tensão superficial deve-se trabalhar em concentrações de óleo de soja residual em torno de 22 g/L e 5,625 g/L de nitrato de amônio (condição do ponto central estudada).

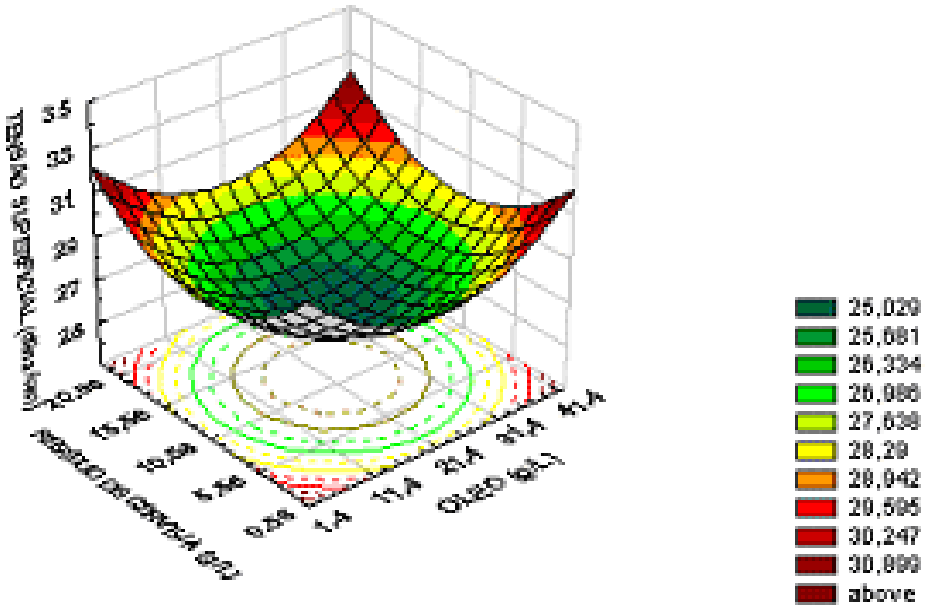


Figura 4.21. Superfície de resposta para a tensão superficial em função da concentração de óleo de soja residual e resíduo de levedura cervejeira.

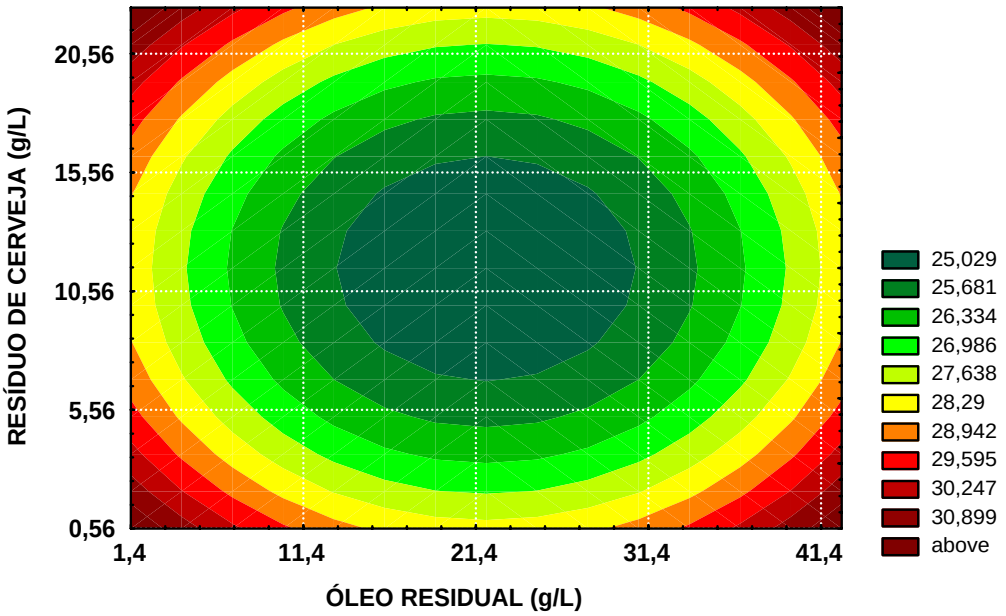


Figura 4.22. Curva de contorno para a resposta tensão superficial em função da concentração de óleo de soja residual e resíduo de cerveja.

Nas Figuras 4.21 e 4.22, pode-se visualizar as faixas de otimização das concentrações do óleo de soja residual (13,5 a 31,0 g/L) e de resíduo de levedura cervejeira (6,60 a 15,56 g/L) que podem ser utilizadas para a obtenção do menor valor da tensão superficial a partir do meio fermentado.

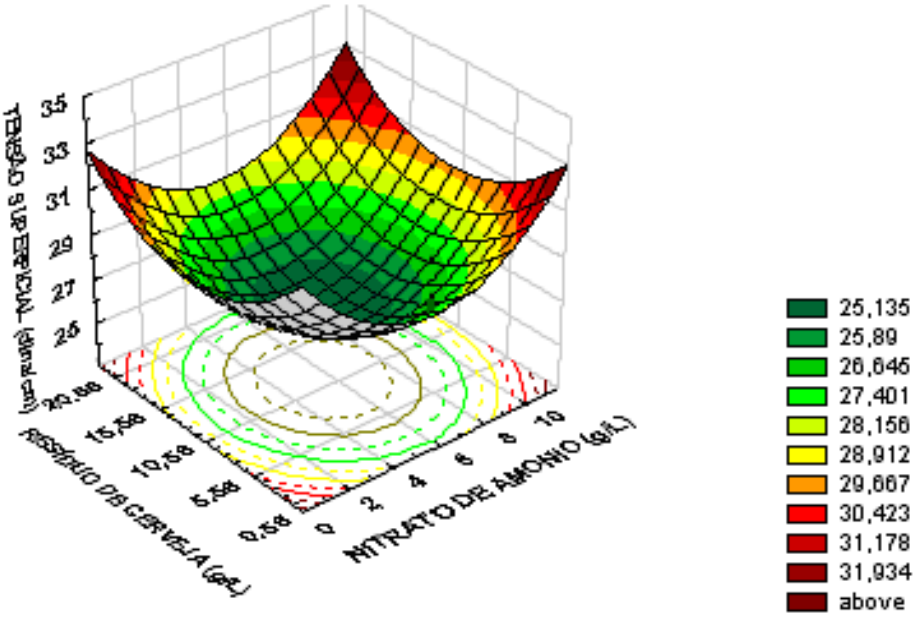


Figura 4.23. Superfície de resposta para a tensão superficial em função da concentração de nitrato de amônio e resíduo de levedura cervejeira.

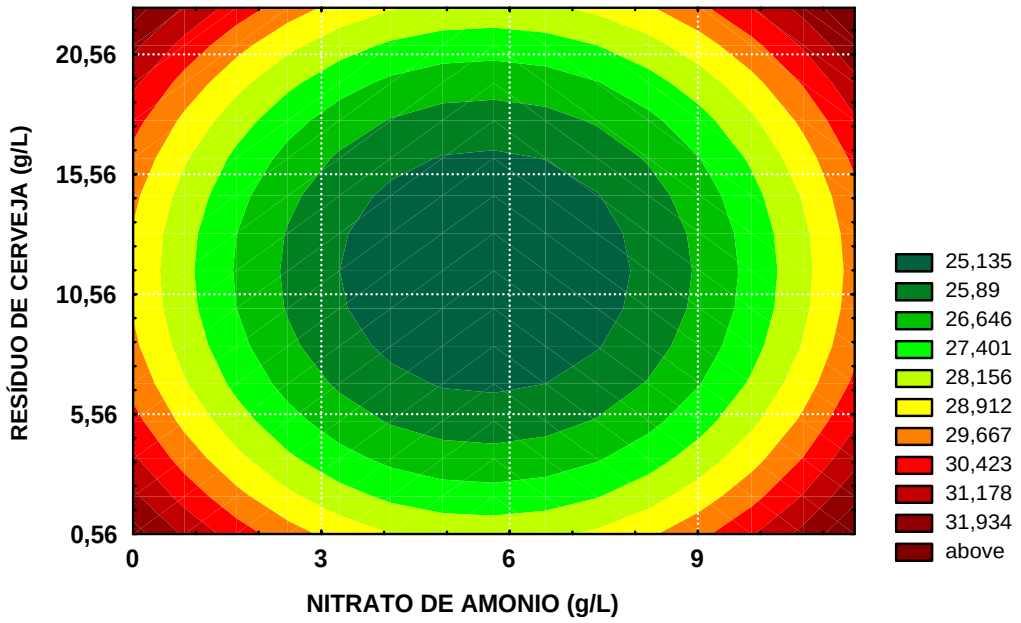


Figura 4.24. Curva de contorno para a resposta tensão superficial em função da concentração de nitrato de amônio e resíduo de cerveja.

A partir dos resultados obtidos foi possível identificar pelas Figuras 4.23 e 4.24 as faixas de valores das concentrações de nitrato de amônio e de levedura cervejeira residual (6,18 a 16,56 e 3,3 a 8,0 g/L, respectivamente) que diminuem ao máximo a variável independente (tensão superficial).

4.4.3. Análise de regressão dos resultados obtidos para o índice de emulsão a partir das variáveis estudadas

Com a realização da regressão múltipla e análise estatística dos dados, gerou-se a Equação geral (4.13) que apresenta a correlação encontrada para representar o índice de emulsão em função das variáveis estudadas.

$$\text{Índice de emulsão} = 102{,}86 + 0{,}847X_1 - 4{,}937X_2 - 0{,}479X_3 - 8{,}745X_1^2 - 9{,}952X_2^2 - 6{,}029X_3^2 + 2{,}00X_1X_2 - 2{,}5X_1X_3 + 1{,}25X_2X_3 \quad (4.13)$$

A Tabela 4.7 apresenta os resultados obtidos dos efeitos significativos para as variáveis estudadas, juntamente com o coeficiente de determinação (R^2) e o valor de F da distribuição de Fisher para a resposta índice de emulsão.

Os parâmetros com nível de significância maior que 10% em um teste de hipótese utilizando t de Student foram desprezados. Neste sentido, desprezaram-se as seguintes variáveis lineares X_1 (OQ), X_3 (LCR) e as interações X_1X_2, X_1X_3 e X_2X_3.

Tabela 4.7. Resultados da regressão para o índice de emulsão

Fator Codificado	Símbolos	Parâmetro	t de student	Nível de significância
Constante	β_0	102,8600	33,8538	1,79E-12
X_2	NA	-4,9375	-3,6700	0,0089
X_1X_1	$(OQ)^2$	-8,7457	-3,9078	0,0024
X_2X_2	$(NA)^2$	-9,9528	-4,4472	0,0009
X_3X_3	$(LCR)^2$	-6,0297	-2,6942	0,0208
$R^2 = 0,83$		$F_C = 13,08$		$F_T = 5,41$

Nota-se através da Tabela 4.7, que a única variável isolada que influenciou significativamente foi à concentração de nitrato de amônio.

Todos os Experimentos testados (Tabela 4.4) foram capazes de produzir compostos que propiciaram a formação de emulsões estáveis por 24 horas. Esta análise é uma medida prática da utilidade de um biossurfactante, pois é sua capacidade de emulsionar líquidos não miscíveis, com formação de emulsões estáveis.

Os biossurfactantes produzidos pela bactéria P*seudomonas aeroginosa* nos meios 15 e 16 foram os que tiveram uma melhor atividade emulsificante, de 100%, mais uma vez demonstrando que as concentrações das variáveis próximas ao ponto central estão dentro da região de otimização.

A equação empírica ajustada para representar o índice de emulsão está disposta na Equação 4.14.

$$\text{Índice de emulsão} = 102,86 - 4,937X_2 - 8,745X_1^2 - 9,952X_2^2 - 6,029\,X_3^2 \qquad (4.14)$$

As Figuras 4.25 e 4.26 mostram o comportamento dos resíduos para os testes de índice de emulsão. Da mesma forma que para os outros dois testes de síntese de raminose e tensão superficial, a distribuição dos resíduos foi aleatória em torno de zero e sem nenhuma tendência, e os valores observados ficaram próximos dos preditos, indicando variância constante e uma distribuição normal dos mesmos.

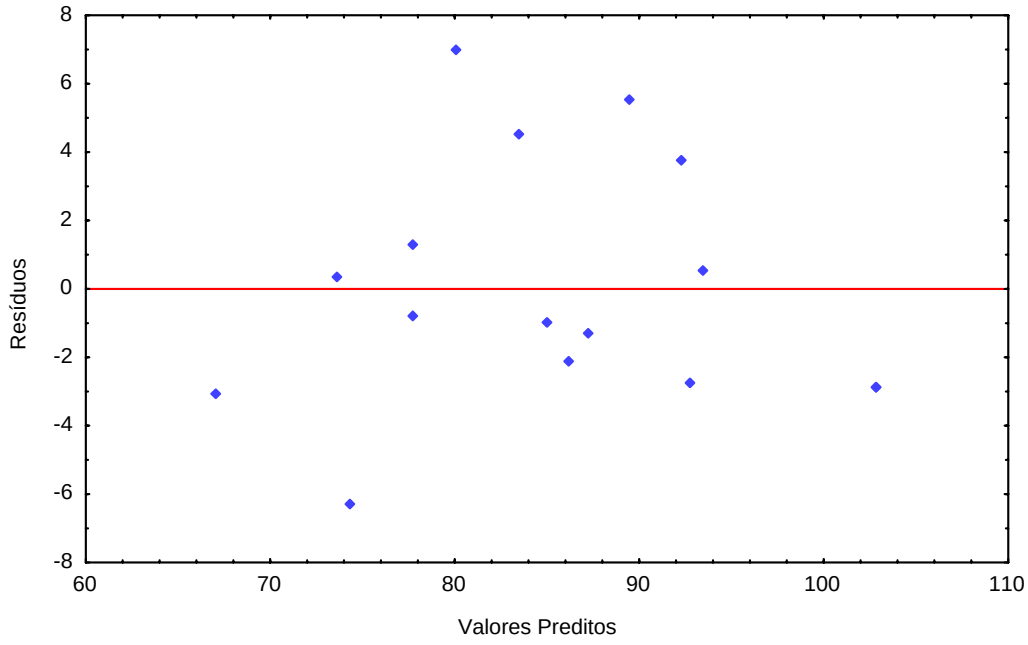


Figura 4.25. Distribuição dos resíduos relativos ao índice de emulsão.

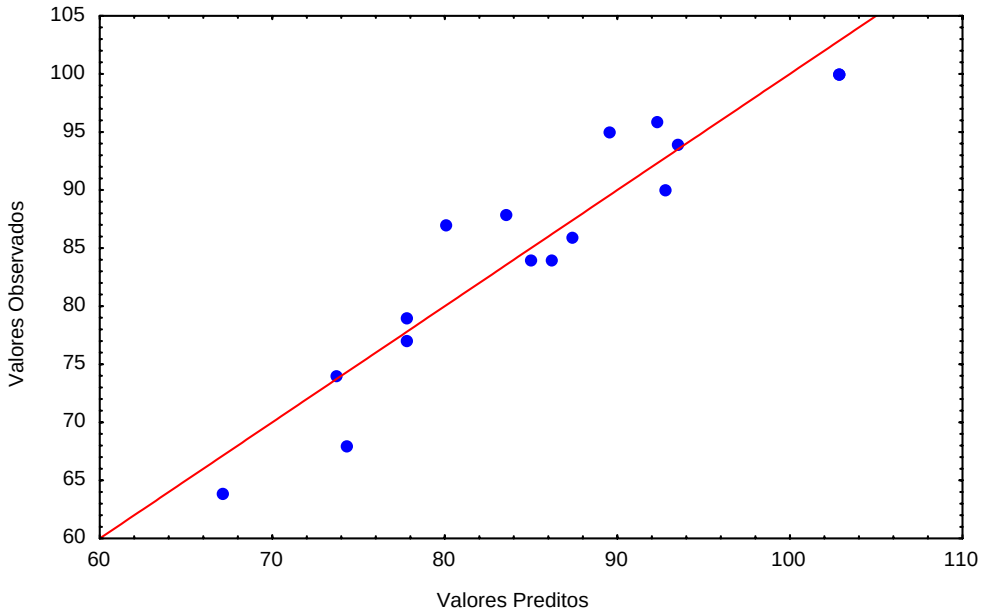


Figura 4.26. Valores preditos em função dos observados relativos ao índice de emulsão.

Com a equação completa (4.13) calculou-se o ponto estacionário para o índice de emulsão que maximizou a resposta. Sendo eles: x_1= 0,0301, x_2 = -0,2495 e x_3 = -0,0718.

Os valores de λ's referentes ao índice de emulsão indicaram que esta resposta possui ponto de máximo, pois λ_1 = -10,8124, λ_2 = -8,3857 e λ_3 = -5,5302 apresentam sinais iguais e negativos.

Utilizando as equações de codificação (3.2), (3.3) e (3.4), obtêm-se os valores reais das concentrações das variáveis no ponto de maximização do índice de emulsão.

X_1= 22,482 g/L de óleo de soja residual;

X_2 = 5,515 g/L de nitrato de amônio;

X_3 = 10,888 g/L de levedura cervejeira residual.

A partir dos valores codificados das variáveis x_1, x_2 e x_3 no ponto de máximo, determinou-se que o índice de emulsão neste ponto foi de 100,0%. Comparando este valor com os valores do índice de emulsão nos Experimentos 15 e 16 (100%), verifica-se que os resultados foram iguais, uma vez, que as condições do ponto de máximo foram próximas a do ponto central.

Com a equação do modelo ajustado (4.14), geraram-se as superfícies de respostas (Figuras 4.27, 4.29 e 4.31), com suas respectivas curvas de contorno (Figuras 4.28, 4.30 e 4.32).

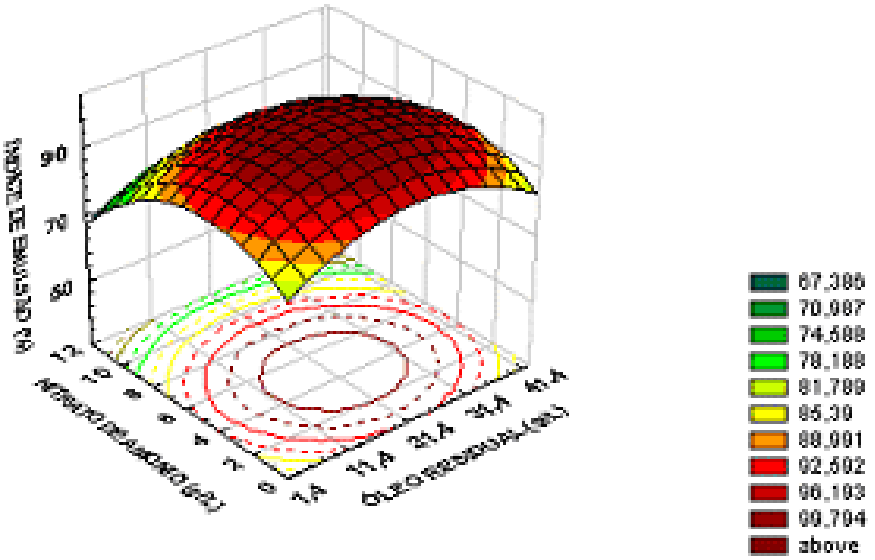


Figura 4.27. Superfície de resposta para o índice de emulsão em função da concentração de óleo de soja residual e nitrato de amônio.

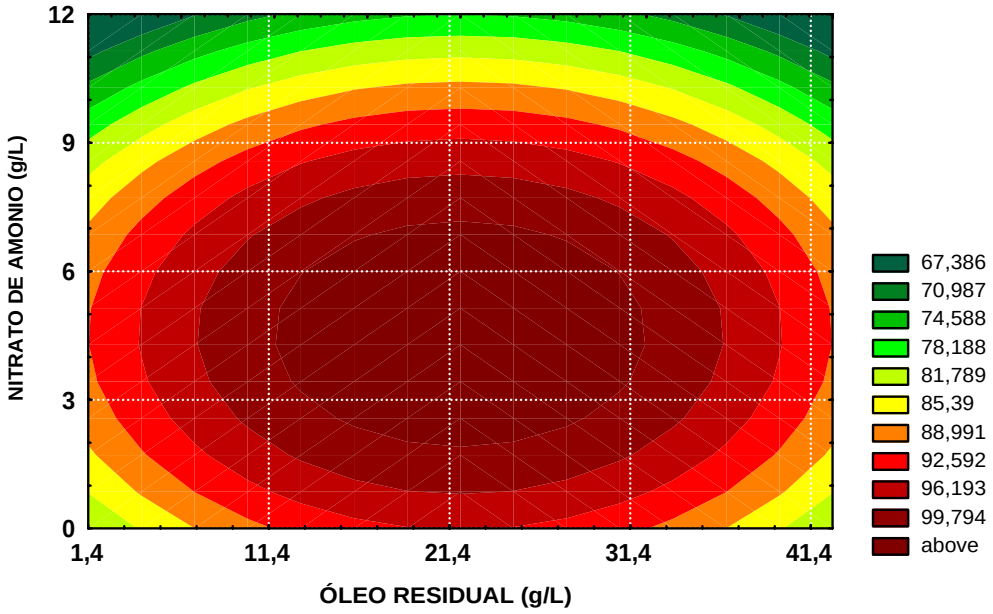


Figura 4.28. Curva de contorno para a resposta índice de emulsão em função da concentração de óleo de soja residual e nitrato de amônio.

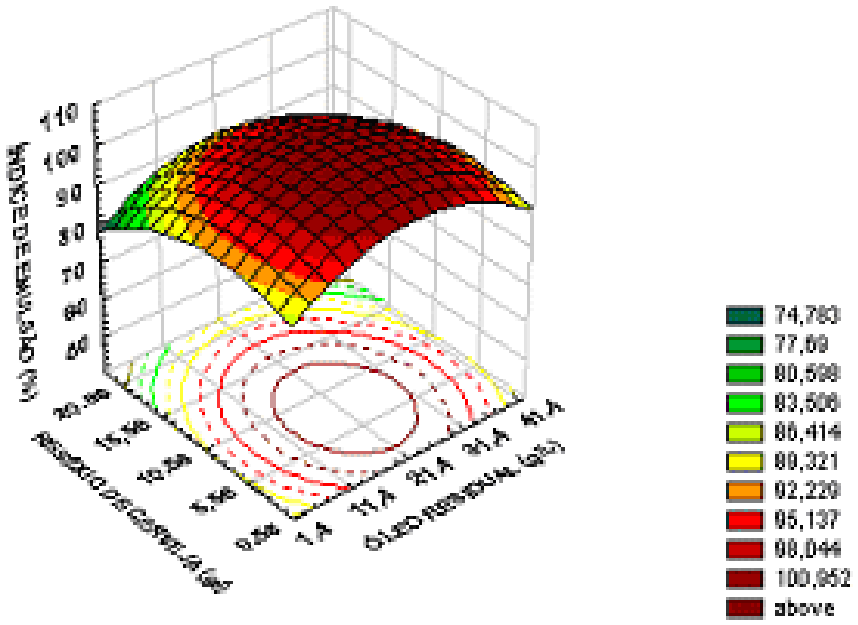


Figura 4.29. Superfície de resposta para o índice de emulsão em função da concentração de óleo de soja residual e resíduo de cerveja.

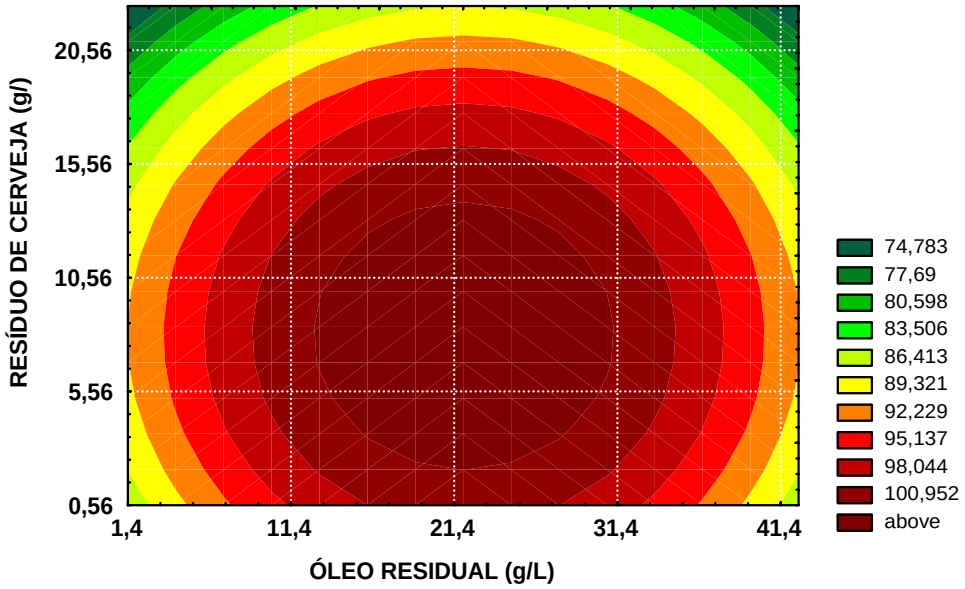


Figura 4.30. Curva de contorno para a resposta índice de emulsão em função da concentração de óleo de soja residual e resíduo de cerveja.

As curvas de contorno da Figura 4.28 indicam a existência de uma região ótima para o índice de emulsificação que varia de 11,4 a 31,4 g/L para o óleo se soja residual e de 2,0 a 7,0 g/L para o nitrato de amônio.

Com relação à Figura 4.30 a região ótima para óleo de soja residual e para a levedura cerejeira residual, encontra-se entre 13,4 a 30,0 g/L e 2,56 a 13,56, respectivamente. Esta metodologia fornece informações mais adequadas pelo número de ensaios realizados. Evidentemente uma condição de concentração de óleo de soja residual, nitrato de amônio e levedura cervejeira residual foi fixado para a maximização do crescimento celular, ou seja, 22,48, 5,5 e 10,88 g/L, respectivamente. No entanto, este resultado de faixa ótima das variáveis é muito mais interessante do que apenas um valor pontual, pois fornece informações (concentrações ideais) que mantenham o processo nas condições otimizadas.

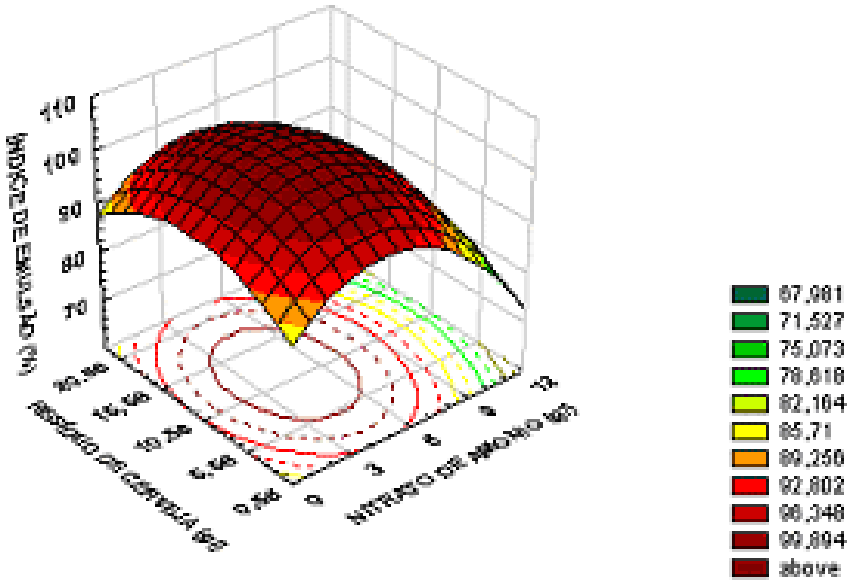


Figura 4.31. Superfície de resposta para o índice de emulsão em função da concentração de nitrato de amônio e resíduo de cerveja.

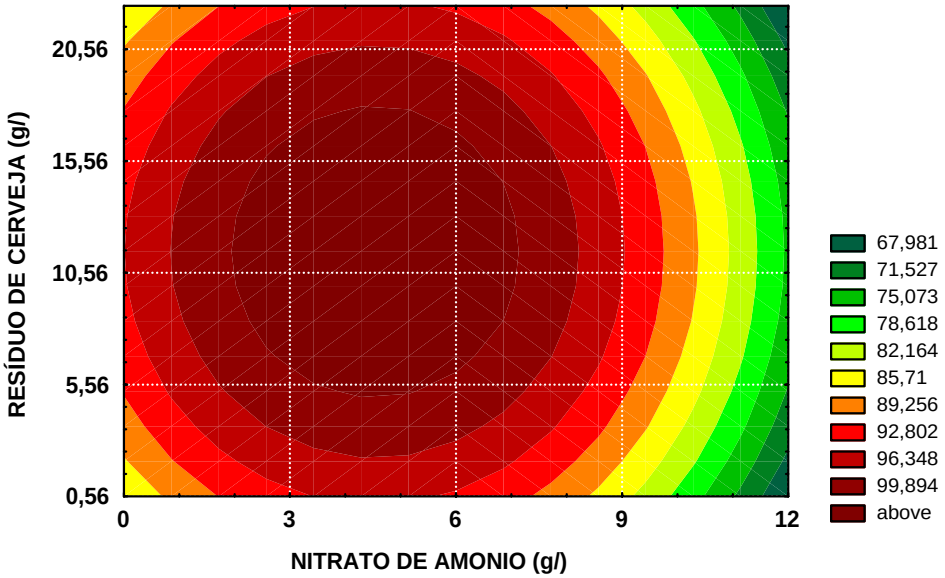


Figura 4.32. Curva de contorno para a resposta índice de emulsão em função da concentração de nitrato de amônio e resíduo de cerveja.

A partir da Figura 4.32, observa-se que para maximizar o índice de emulsificação, as concentrações de nitrato de amônio devem estar em torno do ponto central e conseqüentemente dentro da faixa de otimização (2,0 a 7,0 g/L). O mesmo é verificado para a concentração de resíduo de cerveja onde a faixa ótima varia de 5,5 a 17,56 g/L.

4.4.4. Análise de regressão dos resultados obtidos para o crescimento celular a partir das variáveis estudadas.

Como nos casos anteriores, após a realização da regressão múltipla e análise estatística dos dados, gerou-se a Equação geral (4.15) que apresenta a correlação encontrada para representar o crescimento celular em função das variáveis estudadas.

$$\text{Biomassa} = 4{,}240 + 0{,}222X_1 + 0{,}407X_2 + 0{,}094X_3 - 0{,}355X_1^2 - 0{,}577X_2^2 - 0{,}328X_3^2 - 0{,}104X_1X_2 + 0{,}067X_1X_3 - 0{,}082X_2X_3 \quad (4.15)$$

A Tabela 4.8 apresenta os resultados obtidos dos efeitos significativos para as variáveis do planejamento, juntamente com o coeficiente de determinação (R^2) e o valor de F da distribuição de Fisher para a resposta crescimento celular.

Os parâmetros com nível de significância maior que 10% em um teste de hipótese utilizando t de Student foram desprezados. Neste sentido, desprezaram-se as seguintes interações X_1X_2, X_1X_3 e X_2X_3.

Tabela 4.8. Resultados da regressão para o crescimento celular

Fator Codificado	Símbolos	Parâmetro	t de student	Nível de significância
Constante	β	4,2399	32,2621	1,93E-11
X_1	OSR	0,2216	3,2873	0,0081
X_2	NA	0,4073	6,0408	0,0001
X_1X_1	$(OQ)^2$	-0,3553	-3,6707	0,0043
X_2X_2	$(NA)^2$	-0,5771	-5,9620	0,0001
X_3X_3	$(LCR)^2$	-0,3281	-3,3902	0,0068
$R^2 = 0{,}91$		$F_C = 21{,}56$		$F_T = 5{,}64$

Os sinais das variáveis isoladas X_1 e X_2 mostram que maiores concentrações do óleo de soja residual e de nitrato de amônio no meio fermentativo promovem maiores quantidades de biomassa. Os coeficientes dessas variáveis indicam um maior efeito da concentração de nitrogênio no crescimento celular.

A equação empírica ajustada para representar o crescimento celular está representada na Equação 4.16.

$$\text{Biomassa} = 4{,}239 + 0{,}221X_1 + 0{,}407X_2 - 0{,}355X_1^2 - 0{,}577X_2^2 - 0{,}328X_3^2 \quad (4.16)$$

Os parâmetros relacionados às variáveis apresentaram resultados de t de Student satisfatórios, sendo os valores dos parâmetros superiores aos seus desvios padrão. Da mesma forma o valor do coeficiente de determinação R2 de 0,91 mostrou que 91% da variabilidade dos dados foram, explicados pela equação empírica.

As Figuras 4.33 e 4.34 mostram o comportamento dos resíduos para os testes do crescimento celular, verifica-se que a distribuição dos resíduos foi aleatória, em torno de zero e sem nenhuma tendência, e os valores observados ficaram próximos dos preditos, indicando variância constante e uma distribuição normal dos mesmos.

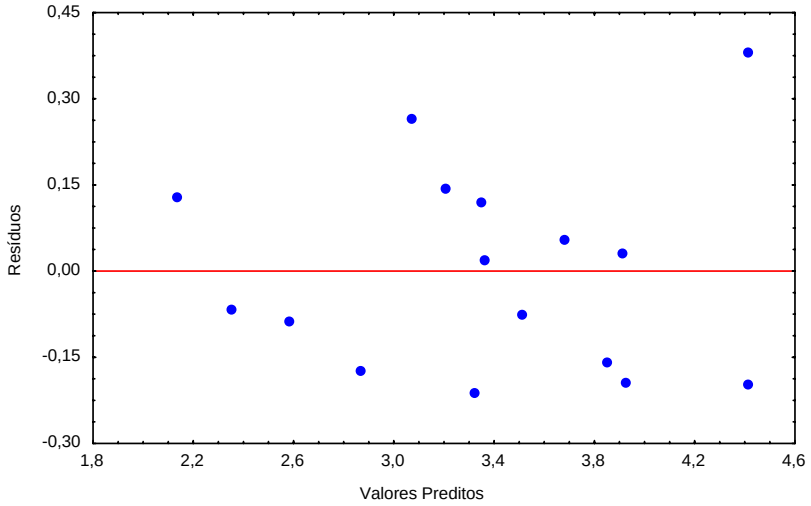


Figura 4.33. Distribuição dos resíduos relativos ao crescimento celular.

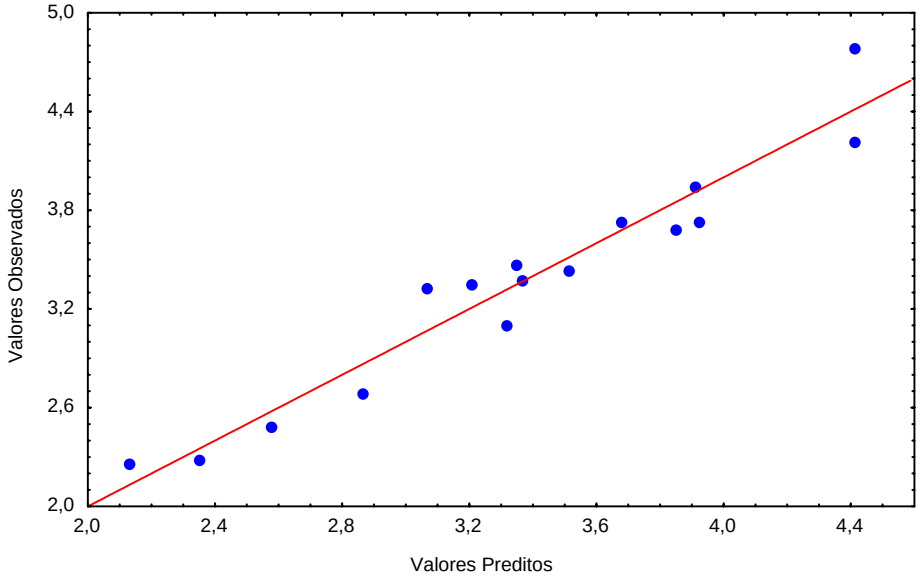


Figura 4.34. Valores preditos em função dos observados relativos ao crescimento celular.

Com a equação completa (4.15) foi calculado o ponto estacionário para o crescimento celular, utilizando o programa Maple VIII *release* 4. Valores de λ's referentes ao crescimento celular indicaram que esta resposta possui ponto de máximo, pois λ_1 = -0,5927, λ_2 = -0,3761 e λ_3 = -0,2913 apresentam sinais iguais e negativos.

As coordenadas x_1 = 0,2773, x_2 = 0,3184 e x_3 = 0,1326, representam os valores codificados que maximizam a resposta. Verifica-se que o ponto estacionário está dentro da região estudada

Utilizando as equações de codificação (3.2), (3.3) e (3.4), obtêm-se os valores reais das concentrações das variáveis no ponto de maximização do crescimento celular.

X_1= 26,437 g/L de óleo de soja residual;

X_2 = 7,018 g/L de nitrato de amônio;

X_3 = 12,629 g/L de levedura cervejeira residual.

A partir dos valores codificados das variáveis x_1, x_2 e x_3 no ponto de máximo, determinou-se que a concentração do crescimento celular neste ponto foi de 4,340 g/L. Comparando este valor com a concentração do crescimento celular nos Experimentos 15 e 16, nos quais foram obtidos as maiores quantidades de biomassa, verificam-se resultados similares.

A equação do modelo ajustado (4.16) foi altamente significativa, sendo possível construir as superfícies de respostas (Figuras 4.35, 4.37, 4.39), as curvas de contorno (Figuras 4.36, 4.38 e 4.40) e definir as regiões de interesse. Estas podem ser observadas através da existência de uma região ótima para o crescimento celular onde se encontram uma faixa de combinações de concentrações de óleo de soja residual e nitrato de amônio (15,4 a 38,4 g/L e 5,0 a 9,5 g/L, respectivamente - Figura 4.36), óleo de soja residual e levedura cervejeira residual (17,4 a 36,4 g/L e 6,56 a 16,56 g/L, respectivamente – Figura 4.38) e nitrato de amônio e levedura cervejeira residual (2,5 a 8,5 g/L e 14,56 a 22,5 g/L, respectivamente – Figura 4.40). Para se obter a maximização do crescimento celular a concentração do óleo de soja residual deve estar em 26,44 g/L, nitrato de amônio em 7,02 g/L e levedura cervejeira residual em 12,63 g/L.

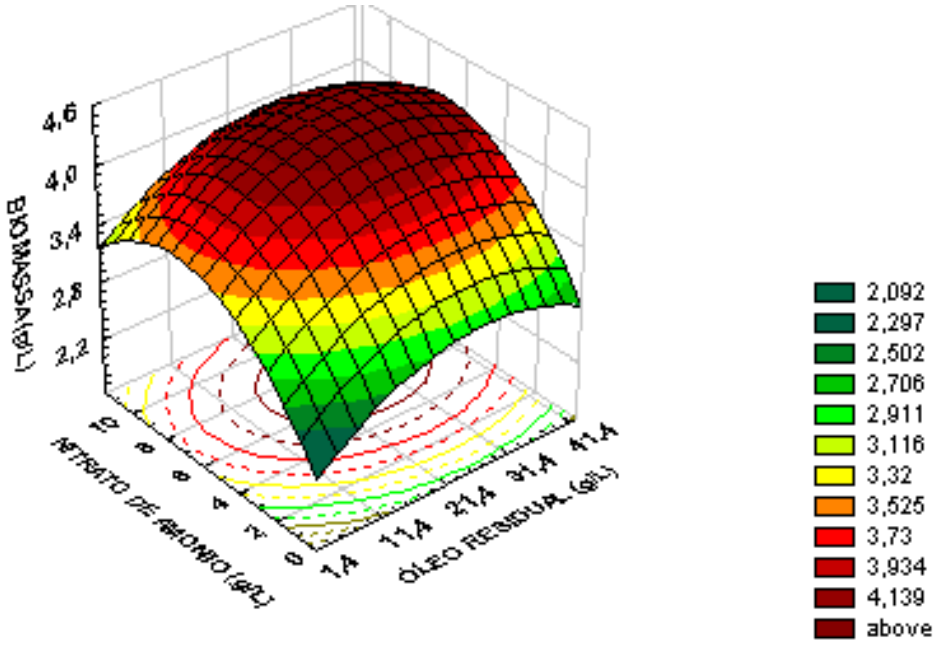


Figura 4.35. Superfície de resposta para a biomassa em função da concentração de óleo de soja residual e nitrato de amônio.

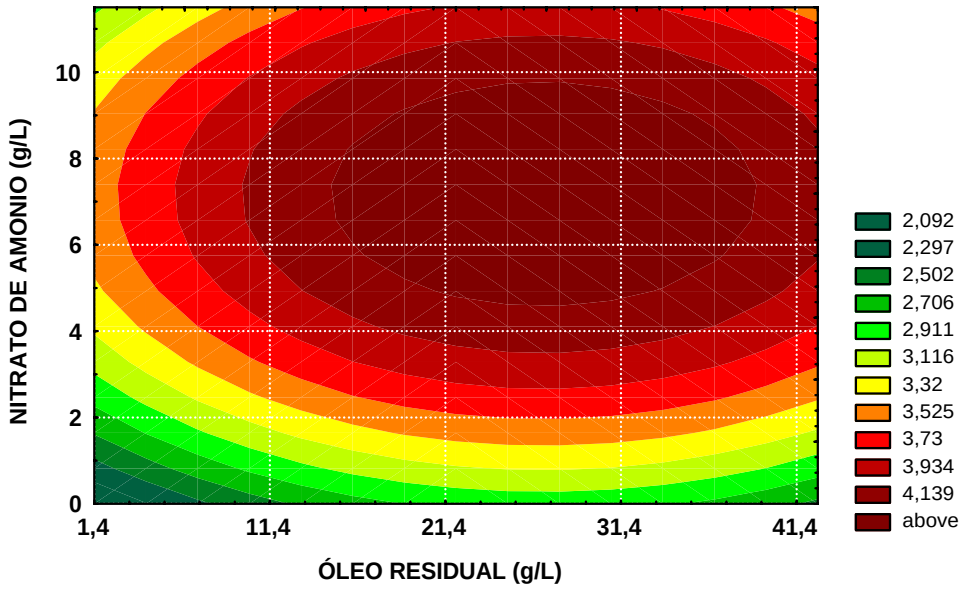


Figura 4.36. Curvas de contorno para a resposta biomassa em função da concentração de óleo de soja residual e nitrato de amônio.

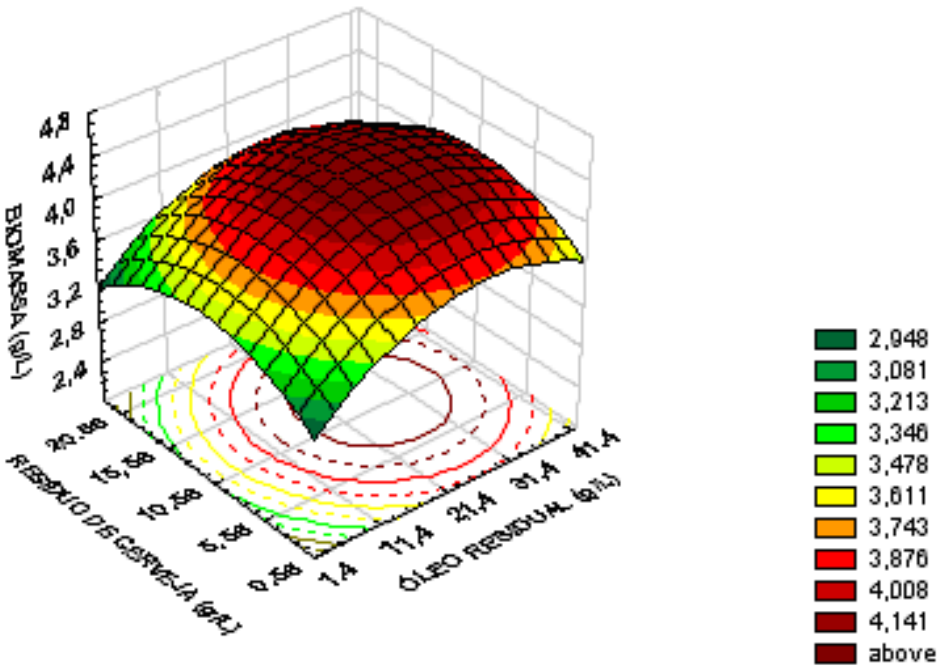


Figura 4.37. Superfície de resposta para a biomassa em função da concentração de óleo de soja residual e resíduo de cerveja.

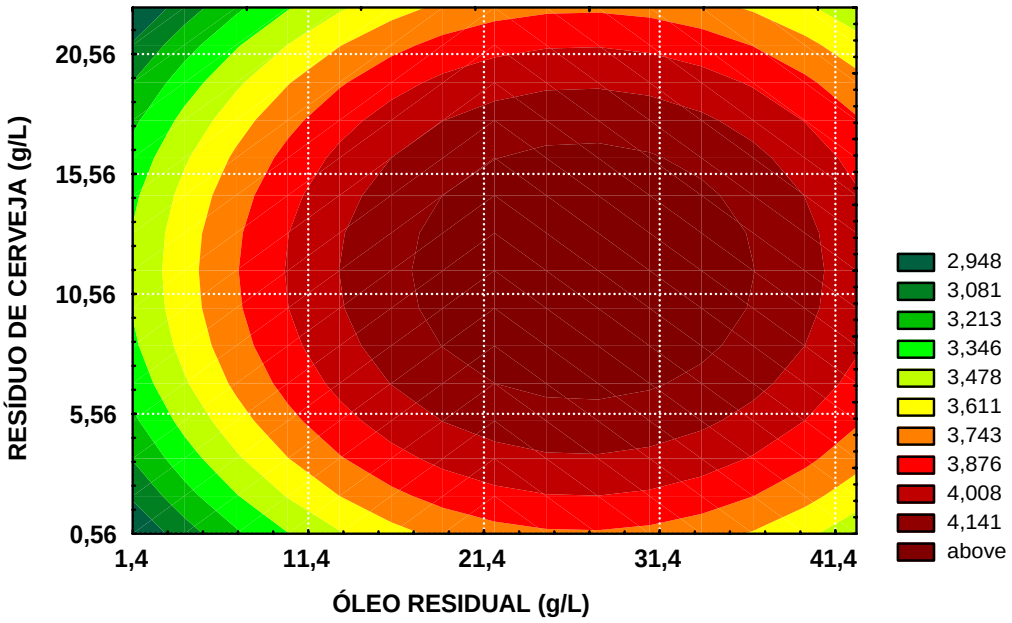


Figura 4.38. Curvas de contorno para a resposta biomassa em função da concentração de óleo de soja residual e resíduo de cereja.

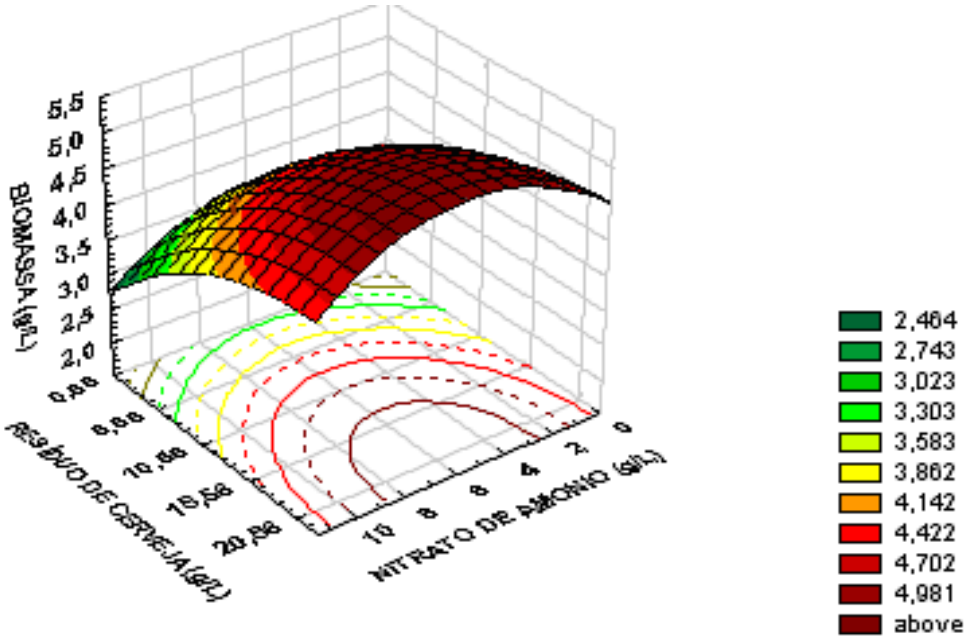


Figura 4.39. Superfície de resposta para a biomassa em função da concentração de nitrato de amônio e resíduo de cerveja.

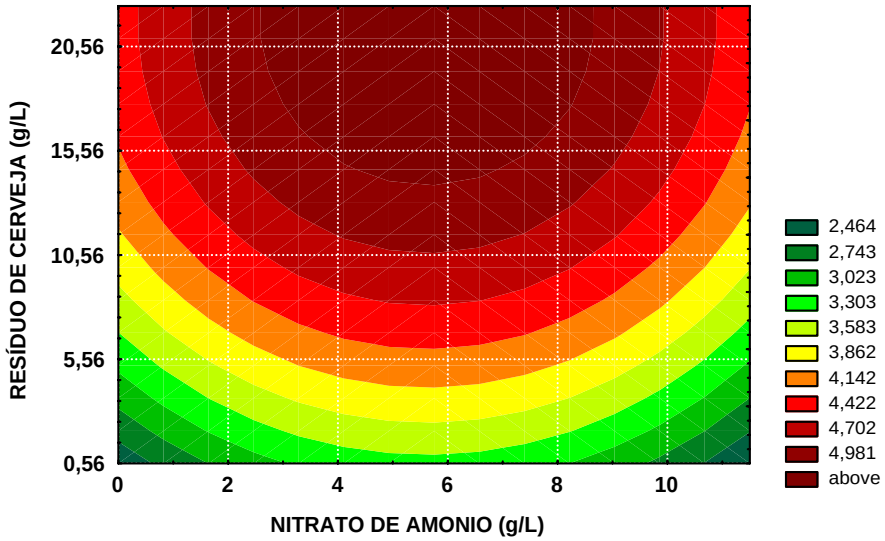


Figura 4.40. Curvas de contorno para a resposta biomassa em função da concentração de nitrato de amônio e resíduo de cerveja.

A Tabela 4.9 apresenta os resultados obtidos no ponto central do planejamento de experimentos (PCC) e os valores reais das concentrações das variáveis independentes OSR, NA e LCR nos pontos de maximização para as respostas raminose, tensão superficial, índice de emulsificação e crescimento celular.

Tabela 4.9. Comparativo dos resultados obtidos no ponto central do planejamento (PCC) com os valores reais resultantes das concentrações das variáveis independentes OSR, NA e LCR

Experimentos	OSR (g/L)	NA (g/L)	LCR (g/L)
Ponto central	22,0	5,625	11,5
Ponto otimização - raminose	22,246	5,729	11,56
Ponto otimização - tensão superficial	21,307	5,692	11,575
Ponto otimização - índice emulsão	22,482	5,515	10,888
Ponto otimização - concentração celular	26,437	7,018	12,629

Concentração de óleo residual (OSR); Concentração de nitrato de amônia (NA); Concentração de levedura cervejeira residual (LCR).

A otimização das respostas analisadas mostrou que os melhores resultados encontrados para a concentração de raminose, tensão superficial, índice de emulsão e biomassa estão localizados muito próximos ao ponto central do planejamento (Experimentos 15 e 16). Portanto, adotou-se o ponto central como ponto de otimização, já que este ponto encontra-se na região de otimização, conforme mostrou as curvas de contorno de cada resposta avaliada.

4.5. Reprodutibilidade do processo fermentativo realizado com as melhores condições experimentais definidas no PCC

Objetivando confirmar a veracidade dos melhores resultados obtidos para as variáveis dependentes (raminose, tensão superficial, índice de emulsão e biomassa) que foram encontrados nas duas réplicas do ponto central realizados no planejamento experimental composto central, Tabela 4.4, (ensaios 15 (C) e 16 (C)), item 4.4, testou-se a reprodutibilidade do processo fermentativo. O comparativo dos resultados encontrados no PCC com a sua respectiva reprodutibilidade (repetição) estão apresentados na Tabela 4.10).

Tabela 4.10. Comparativo dos resultados de produção de raminose, tensão superficial, índice de emulsificação e crescimento celular obtidos no PCC (ensaios 15 (C) e 16 (C)), com a sua respectiva reprodutibilidade (repetição)

Exp.	OSR (g/L)	NA (g/L)	LCR (g/L)	Raminose (g/L)	Tensão Superficial (dina/cm)	Índice Emulsão (%)	X_f (g/L)
15(C)	22	5,625	11,5	2,20	**25,7**	**100**	4,21
16 (C)	22	5,625	11,5	2,30	**25,6**	**100**	4,79
repetição	22	5,625	11,5	2,34	25,6	100	4,87

De acordo com os resultados encontrados, percebe-se a reprodutibilidade entre as três fermentações. Este resultado era esperado, uma vez que este experimento (repetição) foi realizado em condições idênticas ao Experimento 15 e 16 (Tabela 4.4 - item 4.4), ou seja, nas mesmas condições otimizadas obtidas nestes ensaios.

4.6. Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La)

Os ensaios de determinação dos valores de K_La foram realizados em meio MPB (item 3.3.4) em biorreator e tiveram por objetivo estabelecer diferentes condições de aeração a serem utilizas no processo de fermentativo para a produção de raminolipídeos com a cepa *Pseudomonas aeruginosa* PALC. Além disso, proporcionar maior reprodutibilidade dos dados experimentais em reatores com outras geometrias e outros sistemas de distribuição de ar.

Os ensaios com agitação mecânica com injeção de ar resultaram em absorção significativa de oxigênio no sistema, isto é, observou-se um aumento imediato da quantidade de oxigênio dissolvido, sendo a taxa de dissolução de oxigênio proporcional a velocidade de agitação e a taxa de aeração.

A Figura 4.41 apresenta um gráfico típico de correlação da quantidade de oxigênio dissolvido com o tempo para velocidade de 550 rpm e com taxas de aeração de 0,5, 1,0 e 1,5 vvm. Ressaltando que os valores apresentados na Figura 4.41 foram calculados a partir do ajuste da Equação 3.21.

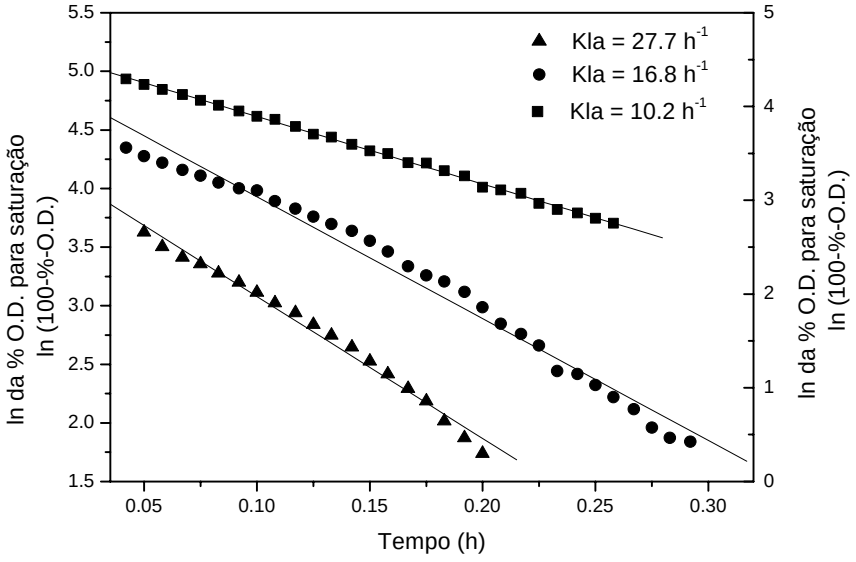


Figura 4.41. Transferência de oxigênio em função da taxa de aeração com velocidade de agitação de 550 rpm e taxas de aeração de 0,5, 1,0 e 1,5 vvm.

A observação da Figura 4.41 e os valores da Tabela 4.11 mostram a importância dessas duas variáveis (agitação e aeração) na transferência de massa de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida. Verifica-se que quanto maiores os valores de agitação e aeração, maiores serão os valores de K_La, que variaram na faixa de 7,6 a 33,5 (Tabela 4.41). Isso se deve ao fato de que os aumentos da aeração e da agitação levam a uma maior turbulência do sistema líquido, conduzindo a uma redução da espessura da película líquida ao redor da bolha gasosa e, conseqüentemente, diminuindo a resistência oposta à transferência de massa (Santa Anna, 2005).

Tabela 4.11. Variação dos valores de K_La em função da taxa de aeração e velocidade de agitação em meio MPB

Velocidade de agitação (rpm)	Vazão de ar (L/h)	Taxa de aeração (vvm)	Valores de K_La (h^{-1})
300	36	0,5	7,6
300	72	1,0	14,6
300	108	1,5	22,2
550	36	0,5	10,2
550	72	1,0	16,8
550	108	1,5	27,7
800	36	0,5	12,8
800	72	1,0	19,7
800	108	1,5	33,5

4.7. Otimização da relação aeração/agitação

A Tabela 4.12 apresenta os resultados em valores médios obtidos dos 9 experimentos realizados de acordo com o planejamento fatorial adotado.

Tabela 4.12. Resultados médios da síntese raminose, índice de emulsificação, tensão superficial e crescimento celular a partir da variação do KLa após 48 horas de fermentação

Exp.	Aeração (vvm)	Agitação (rpm)	K_La (h^{-1})	RM (g/L)	TS (dina/cm)	IE (%)	X_F (g/L)
1	0,5	300	7,6	1,59±0,01	27,5±0,5	100±0	3,79± 0,25
2	0,5	550	10,2	3,26±0,02	26,0±0,5	100±0	4,61±0,15
3	0,5	800	12,8	2,02±0,02	26,5±0,5	100±0	3,96±0,44
4	1,0	300	14,6	0,71±0,03	30,0±0,5	70±2	3,53±0,21
5	1,0	550	16,8	0,81±0,04	29,0±1,0	80±0	4,32±0,14
6	1,0	800	19,7	0,37±0,05	29,5±0,0	57±2	3,71±0,08
7	1,5	300	22,2	0,31±0,01	29,0±1,0	67±2	3,20±0,25
8	1,5	550	27,7	0,50±0,034	28,5±0,5	70±0	4,22±0,21
9	1,5	800	33,5	0,26±0,095	30,0±0,5	50±0	3,91±0,30

Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La); Concentração de raminose (RM); Tensão superficial (TS); Ìndice de emulsão (IE); Crescimento celular final (X_F).

Observa-se na Tabela 4.12 que o aumento do K_La está relacionado não somente ao aumento da taxa de aeração, mas também ao aumento da velocidade de agitação. É ainda possível estabelecer que os processos fermentativos conduzidos nas condições de menor valor de K_La (7,6; 10,2 e 12,8 h^{-1}) propiciaram a produção de maiores quantidades de raminose (1,59; 3,26 e 2,02 g/L, respectivamente). Entretanto, os valores de K_La não apresentaram correlação com o crescimento celular.

O suprimento de oxigênio freqüentemente é limitante para a atividade de microrganismos aeróbicos, devido à baixa solubilidade de oxigênio em meio aquoso. Além disso, espécies de *Pseudomonas* são capazes de realizar respiração anaeróbia usando nitrato. Assim, pode-se concluir que, dentro da faixa estudada de aeração (Tabela 4.12), a baixa disponibilidade de oxigênio estimulou a síntese de raminose. Conforme observado nos Experimentos 1, 2 e 3.

O Experimento 2 propiciou a síntese de maior concentração de raminose (3,26 g/L), ou seja, da maior quantidade de biossurfactante produzido. O valor mínimo de tensão superficial (26,0 dina/cm) é mais um indicativo de que a relação 0.5 vvm/ 550 rpm foi a mais favorável para produção de raminolipídeo a partir de óleo de soja

residual. Ademais, o biossurfactante produzido apresentou intensa característica emulsificante, sendo capaz de formar emulsões totais de QAV (querosene de aviação) em água, estáveis por 24 horas. Nesta condição, também foi máxima a produção de biomassa, em torno de 4,0 g/L.

Haba *et al.* (2000) obtiveram 2,7 g/L de raminose pelo cultivo de *P. aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 em resíduo de óleo de soja, com meio não aerado. Porém, esta mesma linhagem produziu apenas 6,4 g/L de raminose em resíduo de óleo de oliva, com aeração de 1,0 vvm (MERCADÉ *et al*., 1993). Benicasa *et al.* (2002) obtiveram valores ainda menores de raminose, 1,41 g/L, pelo cultivo da linhagem *P. aeruginosa* LBI em biorreator contendo óleo de soja *in natura* como fonte de carbono, com aeração de 2,5 vvm. Baixas produções de 1,75, 1,66 e 1,06 g/L de raminolipídeos também foram obtidas por Rahman *et al.* (2002) a partir de 288 horas de fermentação de óleo de soja, óleo de girassol e glicerol, respectivamente por *P. aeruginosa* GS9-119. Nestas condições, as tensões superficiais foram reduzidas a 28, 30 e 29,1 dina/cm, respectivamente.

Ressalta-se que no presente estudo a aeração foi a variável de processo mais importante, já que na condição de 0,5 vvm (K_La 10,2 h^{-1}) foram obtidos os valores máximos de concentração de raminose e índice de emulsificação, e os valores mínimos de tensão superficial, independente do nível de agitação. No entanto, praticamente não houve variação da concentração final de biomassa nos diferentes combinações ensaiadas de aeração e agitação.

Verifica-se, também, uma relação direta entre a síntese de raminose e índice de emulsão, visto que quanto maior a concentração de biossurfactante no meio, maior foi a sua capacidade emulsificante. Essa propriedade é, provavelmente, a mais versátil dos agentes tensoativos para aplicações práticas e, por isso, tem sido extensivamente estudada (ROSEN, 1989).

Na indústria de alimentos, os biotensoativos são utilizados como emulsificantes no processamento de matérias-primas. A emulsificação exerce um papel importante na formação da consistência e textura exatas, assim como na dispersão de fases (BANAT *et al*, 2000). Cremes, manteiga, maionese, molho de saladas, salsichas, sorvetes, entre outros são exemplos de emulsões em alimentos processados (NITSCHKE et al, 2002).

Na Tabela 4.12, verifica-se que no Experimento 9, onde a velocidade de agitação e o valor do KLa foram maiores, houve menor produção de raminose. Como previsível, o intenso borbulhamento de ar em associação a uma elevada agitação, intensificaram a

formação de espuma, resultando na drenagem de meio fermentado. Aproximadamente 50% do volume de meio foi retirado do reator logo nas primeiras 24 horas de fermentação, o que levou a problemas experimentais, pois com a drenagem da espuma, ocorreu o arraste de células e do produto formado afetando, conseqüentemente, a síntese de raminose. Fatos semelhantes ocorreram com Santos (2002) utilizando a cepa Pseudomonas aeroginosa PA1. O autor não conseguiu conter a formação de espuma utilizando o mesmo sistema de aeração por borbulhamento.

4.8. Resultados do planejamento fatorial completo realizado em biorreator

Nesta etapa foi realizada a otimização das variáveis taxa de aeração e velocidade de agitação no processo de produção de biossurfactante.

A determinação dos parâmetros significativos foi realizada através de um teste de hipótese utilizando uma t de Student com nível de significância de 10%, sendo desconsiderados, para todos os resultados obtidos: produção de raminose, índice de emulsão, tensão superficial e biomassa, os parâmetros que apresentam nível de significância maior que este valor. O coeficiente de correlação quadrático R^2, também foi utilizado para todas as respostas, a fim de constatar a significância ou não do modelo ajustado.

A seguir, serão apresentados os resultados obtidos para as seguintes respostas: concentração de raminose, tensão superficial, índice de emulsificação e biomassa.

4.8.1. Análise de regressão dos resultados obtidos na produção de raminose a partir das variáveis estudadas

Através da regressão múltipla no programa Statistic 5.1, obteve-se a equação completa (4.17) para a síntese da raminose:

$$\text{Raminose} = 1{,}065 - 0{,}962X_1 + 0{,}008X_2 + 0{,}692X_1^2 - 0{,}652X_2^2 - 0{,}122X_1X_2 \qquad (4.17)$$

Contudo, foram eliminadas as variáveis com nível de significância superior a 10%, ou seja, a variável linear X_2 (agitação) e a interação X_1X_2 (aeração/agitação).

A Tabela 4.13 apresenta os resultados obtidos dos efeitos significativos das variáveis estudas, juntamente com o coeficiente de determinação (R^2) como resposta à produção de raminose.

Tabela 4.13. Resultados da regressão para a produção de raminose

Fator Codificado	Parâmetro	t student	Nível de significância
Constante β_0	1,0654	3,5273	0,0166
X_1	-0,9628	-5,8362	0,0020
X_1^2	0,6928	2,4246	0,0597
X_2^2	-0,6522	-2,2823	0,0713
$R^2 = 0,90$			

Nota-se, na Tabela 4.13 que a variável isolada X_1, bem como, as variáveis quadráticas X_1^2 e X_2^2 influenciaram significativamente no processo.

O coeficiente de determinação (R^2) de 0,90, indica um ajuste adequado dos dados experimentais na resposta produção de raminose, frente à equação empírica proposta.

Observa-se, que em todos os ensaios onde se utilizou a agitação de 550 rpm, obtiveram-se os melhores valores para a síntese de raminose. Isto indica que esta condição esta situada na região de otimização do processo fermentativo para a produção de raminose.

Verifica-se, nos ensaios 2, 5 e 8, que com o aumento da aeração (0,5; 1,0 e 1,5, respectivamente) sob agitação constante (550 rpm), ocorreu diminuição da síntese de raminose.

A equação empírica ajustada que representa a síntese de raminose esta descrita na Equação 4.18.

$$\text{Raminose} = 1,065 - 0,963X_1 + 0,693X_1^2 - 0,652X_2^2 \qquad (4.18)$$

A partir da equação completa (4.17) foi utilizado um algoritmo de otimização, implementado no software Maple VIII release 4, para calcular as coordenadas do ponto estacionário para a sínese de raminose, são elas: $x_1 = 0,6897$ e $x_2 = - 0,0583$. No ponto estacionário as coordenadas x_1 e x_2 estão dentro da região experimental.

Os pontos estacionários e os respectivos λ's (λ_1 -0,6849 e λ_2=0,6956) referentes à produção de raminose indicaram que esta resposta possui um ponto de sela.

Ainda usando o algoritmo feito no programa Maple VIII release 4, calcularam-se os X's correspondentes à maximização da resposta para a síntese de raminose, utilizando a forma canônica $Y = y_0 + \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2$. Sendo assim, os pontos de cela são: $x_1 = -0,9985$ e $x_2 = 0,0181$

Com as equações de codificação (02) e (03), obteve-se os valores reais para as variáveis X_1 e X_2 no ponto de otimização.

X_1 = 0,5007 vvm

X_2 = 555 rpm

A partir da equação 4.18, obteve-se a superfície de resposta e as curas de contorno, as quais estão respectivamente apresentadas nas Figuras 4.42 e 4.43.

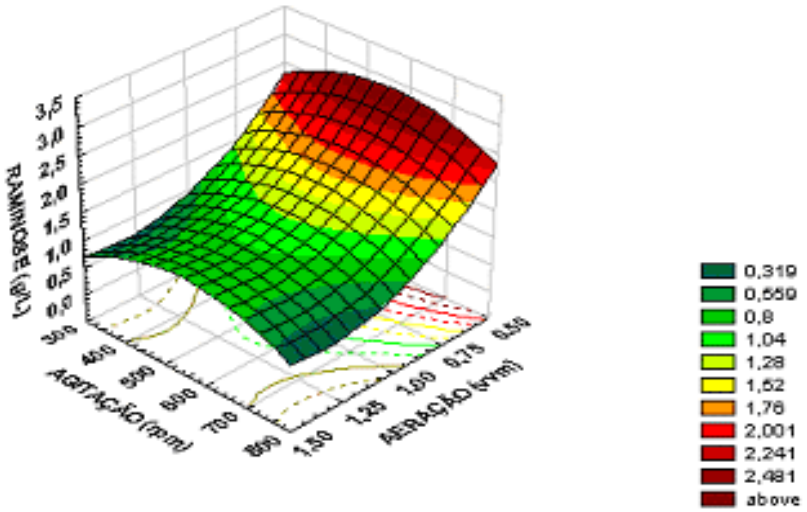


Figura 4.42. Superfície de resposta da concentração de raminose em função da agitação e aeração para a produção de raminose.

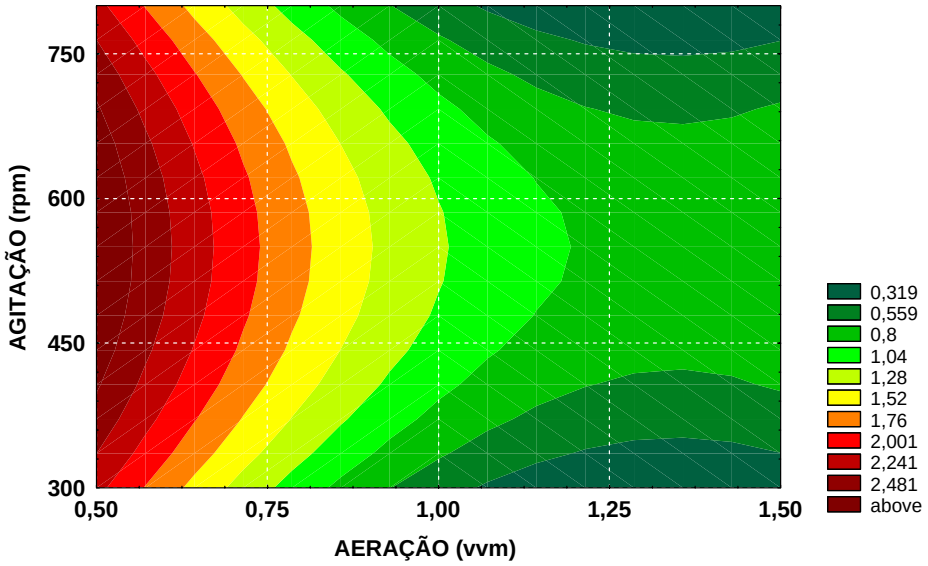


Figura 4.43. Curvas de contorno em função da agitação e aeração para a produção de raminose.

Constata-se na Figura 4.42 que aumentando a vazão de ar no meio fermentativo acarreta uma diminuição da síntese de raminose. Nota-se, também, que a máxima produção de raminose foi obtida com a velocidade de agitação a 550 rpm e taxa de aeração a 0,5 vvm. Além disso, pelas Figuras 4.42 e 4.43, verifica-se a existência de uma região ótima para a produção de raminose onde se encontra uma faixa de combinações de aeração (0,5 a 0,55 vvm) e agitação (400 a 700 rpm). A partir desta análise, sabe-se qual a variação de agitação (± 150 rpm) que pode ser admitida ao redor de 550 rpm (valor ótimo) e da taxa de aeração 0,5 vvm (+ 0,05 vvm) que manterá o processo na condição otimizada.

4.8.2. Análise de regressão dos resultados obtidos na tensão superficial a partir das variáveis estudadas

Após a realização da regressão múltipla no programa Statistica 5.1, obteve-se a Equação completa (4.19) para a tensão superficial (Ts):

$$\text{Tensão superficial} = 28{,}888 + 1{,}25X_1 - 0{,}083X_2 - 1{,}583X_1^2 + 0{,}916X_2^2 + 0{,}5X_1X_2 \quad (4.19)$$

Eliminadas as variáveis com nível de significância superior a 10%, desprezou-se a variável linear X_2 (agitação).

A Tabela 4.14 apresenta os resultados obtidos dos efeitos significativos das variáveis estudas, juntamente com o coeficiente de determinação (R^2) tendo como resposta à tensão superficial.

Tabela 4.14. Resultados da regressão para a tensão superficial

Fator Codificado	Parâmetro	t student	Nível de significância
Constante β_0	28,88	198,3202	6,3E-08
X_1	1,25	15,6670	0,000097
X_1^2	-1,58	-11,4574	0,000331
X_2^2	0,91	6,6332	0,002680
X_1X_2	0,50	5,1168	0,006901
$R^2 = 0{,}98$			

Nota-se, na Tabela 4.14, que a variável isolada X_1, bem como, as variáveis quadráticas X_1^2 e X_2^2 e a interação X_1X_2 (aeração/agitação) influenciaram significativamente no processo.

Observam-se, nos resultados que com o aumento da concentração da raminose há uma diminuição da resposta tensão superficial.

Nos experimentos realizados (Tabela 4.12), percebe-se que a alteração na vazão de ar e no nível de agitação não promoveram uma mudança significativa da tensão superficial do meio. Contudo, a aeração e agitação em torno de 0,5 vvm e 550 rpm, respectivamente, obteve-se o menor valor para a tensão superficial, demonstrando que estes parâmetros adotados estão possivelmente dentro da região de otimização do processo.

A equação empírica ajustada que representa a tensão superficial esta descrita na Equação 4.20.

$$\text{Tensão superficial} = 28{,}888 + 1{,}25X_1 - 1{,}583X_1^2 + 0{,}916X_2^2 + 0{,}5X_1X_2 \qquad (4.20)$$

A partir da equação completa (4.19) foi utilizado um algoritmo, implementado no software Maple VIII *release* 4, para calcular os pontos estacionários para a tensão superficial. Sendo eles:

$x_1 = 0{,}4357$

$x_2 = -0{,}0307$

Os pontos estacionários e os respectivos λ's (λ_1=-1,4441 λ_2=0,8607) referentes à tensão superficial indicaram que esta resposta possui um ponto de sela.

Com o programa Maple VIII release 4, calculou-se os valores as variáveis codificadas (X's) correspondentes à minimização da resposta para a tensão superficial, utilizando a forma canônica $Y = y_0 + \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2$. Neste caso, os pontos de cela encontrados foram: $x_1 = -0{,}9985$ e $x_2 = 0{,}0181$.

Utilizando as equações de codificação (1) e (2), obtêm-se os valores reais para as variáveis:

$X_1 = 0{,}502$ vvm;

$X_2 = 581{,}16$ rpm.

Os efeitos das variáveis independentes (aeração e agitação) sobre a tensão superficial estão representadas pela superfície de resposta (Figura 4.44) e curvas de contorno (Figura 4.45).

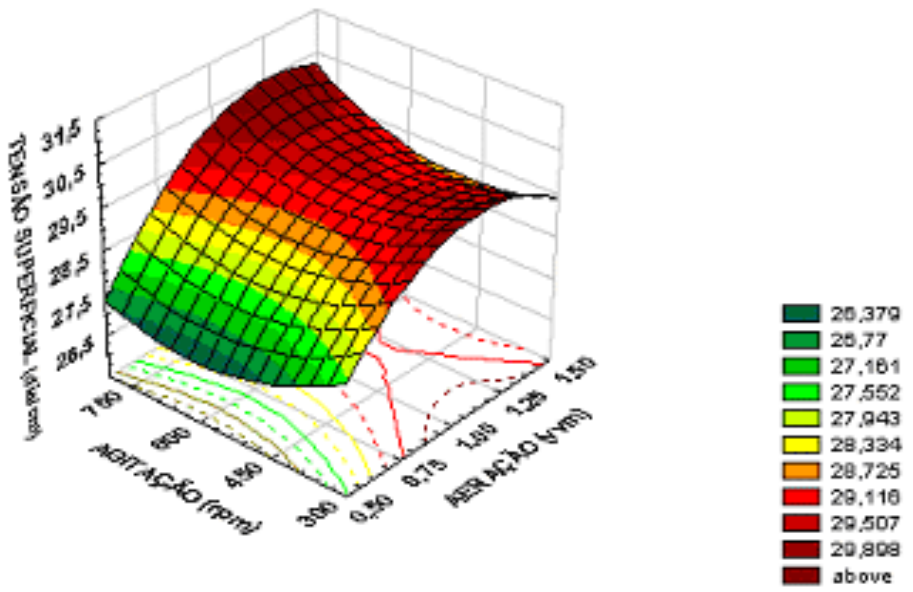


Figura 4.44. Superfície de resposta da tensão superficial em função da agitação e aeração para a tensão superficial.

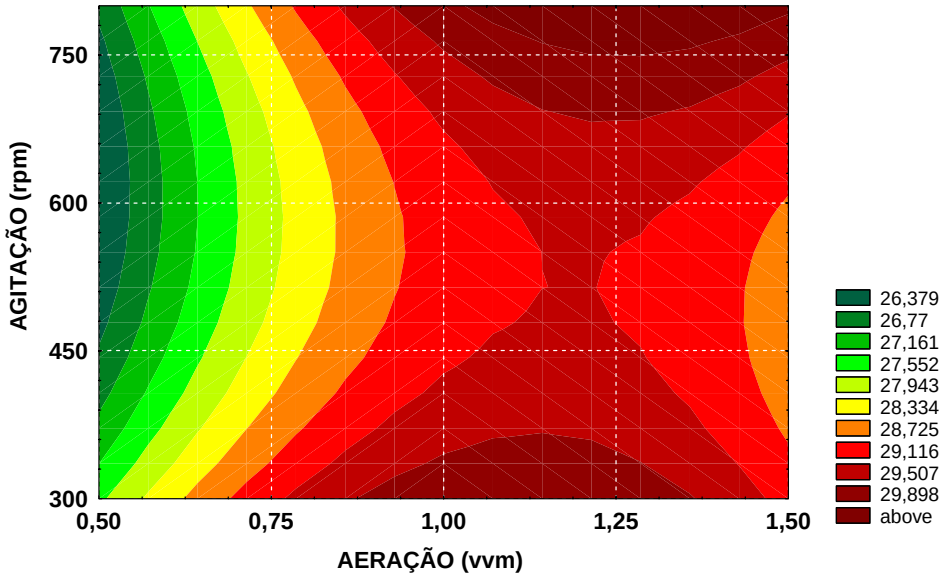


Figura 4.45. Curvas de contorno em função da agitação e aeração para tensão superficial.

Verifica-se na Figura 4.45 que menores valores de tensão superficial são obtidas para menores taxas de aeração no meio fermentado (entre 0,5 a 0,55 vvm) e utilizando velocidades de agitação dentro da região ótima encontrada neste estudo (470 a 750 rpm).

4.8.3. Análise de regressão dos resultados obtidos para o índice de emulsificação a partir das variáveis estudadas

Com a realização da regressão múltipla, gerou-se a Equação geral (4.21), que apresenta a correlação encontrada para representar o índice de emulsão em função das variáveis estudadas.

$$\text{Índice de emulsão} = 75{,}22 - 18{,}83X_1 - 5{,}00X_2 + 12{,}16X_1^2 - 9{,}33X_2^2 - 4{,}25X_1X_2 \quad (4.21)$$

Eliminadas as variáveis com nível de significância superior a 10%, desprezou-se a variável linear X_2 (agitação) e a interação X_1X_2.

A Tabela 4.15 representa os resultados obtidos dos efeitos significativos das variáveis estudas, juntamente com o coeficiente de determinação (R^2) como resposta à tensão superficial.

Tabela 4.15. Resultados da regressão para o índice de emulsificação

Fator Codificado	Parâmetro	t student	Nível de significância
Constante β_0	75,22	12,528	0,000057
X_1	-18,83	-5,726	0,002272
X_1^2	12,16	2,136	0,005750
X_2^2	-9,33	-1,638	0,002227
$R^2 = 0{,}82$			

Nota-se, na Tabela 4.15, que a variável isolada X_1, bem como, as variáveis quadráticas X_1^2 e X_2^2 influenciaram significativamente no processo.

O maior valor do coeficiente da variável X_1 mostra que o efeito da mesma sobre a resposta foi muito significativo, isto justifica os valores de 100% no índice de emulsificação obtida para o nível de aeração de 0,5 vvm.

A equação empírica ajustada que representa o índice de emulsão esta descrita na Equação 4.22.

$$\text{Índice de emulsão} = 75{,}22 - 18{,}83X_1 + 12{,}16X_1^2 - 9{,}33X_2^2 \quad (4.22)$$

A partir da Equação completa (4.21), calculou-se os pontos estacionários para o índice de emulsificação. Sendo eles: $x_1 = 0{,}8764$ e $x_2 = -0{,}2868$.

Os pontos estacionários e os respectivos λ's ($\lambda 1$=-10,5724 e $\lambda 2$=11,0724) referentes à emulsificação indicaram que esta resposta possui um ponto de sela.

Calcularam-se os valores de X's correspondentes à maximização da resposta para o índice de emulsificação, empregando o software Maple VIII release 4. Determinado os pontos de sela em variáveis codificadas x1 = -0,9903 e x2= 0,1787, utilizou-se as equações de codificação (1) e (2), obtendo-se os valores reais para as variáveis:

$X_1 = 0,505$ vvm
$X_2 = 505,32$ rpm

Na superfície de resposta e curvas de contorno, Figuras 4.46 e 4.47 respectivamente, verifica-se o efeito das variáveis independentes sobre o índice de emulsificação.

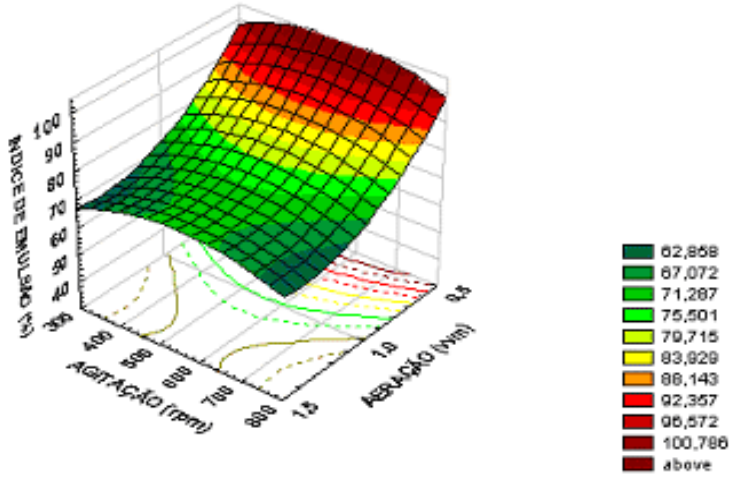


Figura 4.46. Superfície de resposta do índice de emulsificação em função da agitação e aeração para o índice de emulsão.

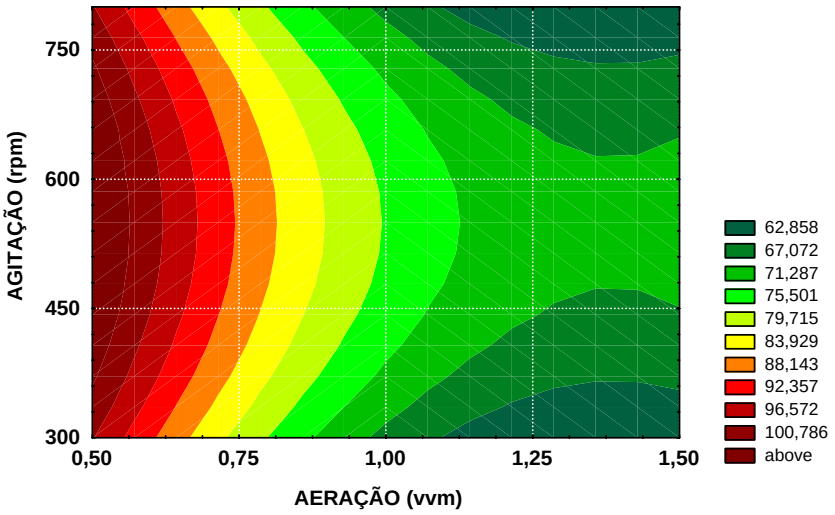


Figura 4.47. Curvas de contorno em função da agitação e aeração para o índice de emulsão.

Analisando a superfície de resposta e as curvas de contorno, Figuras 4.46 e 4.47, observa-se que os valores máximos para o índice de emulsificação (100 %) correspondem à taxa de aeração em 0,5 vvm, ou seja, no nível inferior do planejamento, enquanto que para a velocidade de agitação variou entre 400 a 700 rpm, tendo seu ponto ótimo em 505 rpm.

4.8.4. Análise de regressão dos resultados obtidos para o crescimento celular a partir das variáveis estudadas

Como nos casos anteriores, após a realização da regressão múltipla, obteve-se a Equação geral (4.23) que apresenta a correlação encontrada para representar o crescimento celular em função das variáveis estudadas.

$$\text{Biomassa} = 4{,}32 - 0{,}328X_1 + 0{,}038X_2 + 0{,}088X_1^2 - 0{,}933X_2^2 + 0{,}091X_1X_2 \qquad (4.23)$$

Eliminadas as variáveis com nível de significância superior a 10%, desprezou-se a variável quadrática X_1^2 (aeração).

A Tabela 4.16 apresenta os resultados obtidos dos efeitos significativos das variáveis estudas, juntamente com o coeficiente de determinação (R2) como resposta o crescimento celular.

Tabela 4.16. Resultados da regressão para o crescimento celular

Fator Codificado	Parâmetro	t student	Nível de significância
Constante β_0	4,383	58,217	1,0E-06
X_1	-0,328	-6,135	0,0035
X_2	0,038	-0,726	0,0078
X_2^2	-0,933	-10,077	0,0005
X_1X_2	-0,090	-1,386	0,0380
$R^2 = 0{,}94$			

Percebe-se, na Tabela 4.16, que as variáveis isoladas X_1 e X_2, a variável quadrática X_2^2, bem como a interação X_1X_2 influenciaram significativamente no processo.

A Tabela 4.12 mostra que os maiores resultados para o crescimento celular foram encontrados nos Experimentos 2, 5 e 8 onde a agitação permaneceu constante em

550 rpm, alterando a aeração (0,5; 1,0 e 1,5 rpm). Isso indica que provavelmente esta variável propiciou condições mais adequadas para o crescimento do microrganismo.

A equação empírica ajustada que representa a biomassa (Cc) esta descrita na Equação 4.24.

$$\text{Biomassa} = 4{,}4016 - 0{,}328X_1 + 0{,}038X_2 - 0{,}933X_2^2 + 0{,}091X_1X_2 \qquad (4.24)$$

A partir da Equação completa 4.23, calcularam-se os pontos estacionários ($x_1 = 0{,}7514$ e $x_2 = 0{,}1978$) para o crescimento celular.

Os pontos estacionários e os respectivos λ's (-0,7050 e 0,1010) referentes à biomassa indicaram que esta resposta possui um ponto de sela.

Através do algoritmo (Maple VIII release 4), calcularam-se os X's correspondentes à maximização da resposta para o crescimento celular, utilizando a forma canônica $Y = y_0 + \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2$. Então foram obtidos os valores codificados das variáveis no ponto de maximização da resposta: $x_1 = -0{,}979$ e $x_2 = 0{,}3427$.

Através das equações de codificação (3.11) e (3.12), determinaram-se os valores reais das concentrações das variáveis:

$X_1 = 0{,}51$ vvm

$X_2 = 570$ rpm.

Utilizando a equação do modelo ajustado (4.24), construíram-se as superfícies de respostas (Figura 4.48) e as curvas de contorno (Figura 4.49) definindo-se, então, as regiões de interesse.

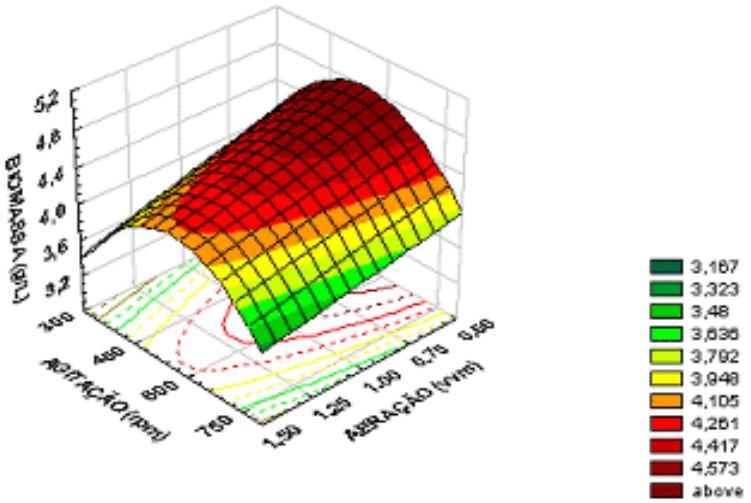


Figura 4.48. Superfície de resposta da concentração de biomassa em função da agitação e aeração para a biomassa.

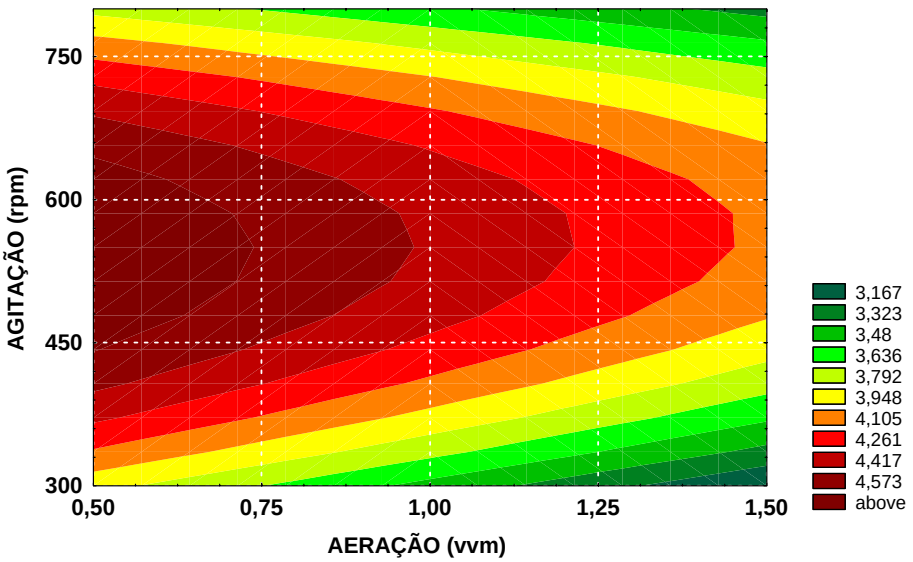


Figura 4.49. Curvas de contorno em função da agitação e aeração para a biomassa.

Analisando as Figuras 4.48 e 4.49, percebe-se a existência de uma região ótima para o crescimento celular que se encontra uma faixa de combinações para a velocidade de agitação (450 a 650 rpm) e para a taxa de aeração (0,5 a 0,73 vvm). No ponto de maximização do crescimento celular à taxa de aeração deve estar em 0,51 vvm e a velocidade de agitação em 570 rpm.

4.9. Estudo da taxa de aeração para valores menores do que o mínimo utilizado no planejamento experimental fatorial completo

Como o ponto de otimização para a aeração foi o menor valor estudado no planejamento, foi necessário verificar se para valores de aeração menores do que 0,5 vvm a produção de raminose seria maior do que o valor obtido no planejamento experimental.

Assim, realizaram-se os experimentos utilizando taxas de aeração de 0,25 e 0,35 vvm e velocidade constante de agitação, em ambos ensaios, a 550 rpm. Como o presente trabalho tem como objetivo principal produzir raminolipídeo adotou-se o valor de agitação obtido a partir da análise de regressão para a síntese de raminose. Na Tabela 4.17, estão apresentados os valores da síntese de raminose, tensão superficial, índice de emulsificação e biomassa em função da aeração.

Tabela 4.17. Variação da síntese de raminose, tensão superficial, índice de emulsificação e biomassa em função da aeração

Exp.	Aeração (vvm)	K_La (h^{-1})	Raminose (g/L)	Tensão Superficial (dina/cm)	Índice Emulsão (%)	Biomassa (g/l)
1	0,25	3,8	2,21	27,0	100	3,892
2	0,35	6,3	2,76	26,5	100	3,912
3	0,5	10,2	3,26	26,0	100	4,61
4	1,0	16,8	0,81	29,0	80	4,32
5	1,5	27,7	0,50	28,5	70	4,22

Analisando os resultados apresentados na Tabela 4.17, observou-se que a maior produção de raminose 3,26 g/L e a menor tensão superficial 26,0 dina/cm foram obtidas para o K_La de 10,2 h^{-1}. Contudo, nota-se também que para aeração do meio fermentado de 0,25 e 0,35 vvm, obteve-se melhores resultados para as variáveis dependentes (raminose, tensão superficial e índice de emulsão) quando comparado aos valores obtidos utilizando aeração de 1,0 e 1,5 vvm.

Com os dados apresentados percebe-se que o aumento do K_La taxa de aeração no meio fermentado a partir de 0,5 vvm promove uma diminuição na concentração de raminose produzida. Isso indica que acima de 0,5 vvm o aumento da taxa de aeração no meio fermentado promove uma limitação para a produção de raminose.

4.10. Reprodutibilidade da fermentação nas melhores condições experimentais definidas no PCC e no planejamento experimental fatorial completo

Visando verificar a reprodutibilidade do processo foram realizadas duas fermentações nas melhores condições experimentais obtidas nos dois últimos planejamentos experimentais. Sendo empregadas as seguintes condições otimizadas do PCC para maximização na produção de raminose: 5,625 g/L de nitrato de amônio, 22 g/L de óleo de soja residual e 11,5 g/L de levedura cervejeira residual e as melhores condições de aeração e agitação encontrada no último planejamento fatorial 0,5 vvm e 550 rpm, respectivamente. Os resultados encontram disponíveis na Tabela 4.18.

Tabela 4.18. Resultados médios de produção de raminose, índice de emulsificação, tensão superficial e crescimento celular obtidos durante a realização do experimento utilizando as melhores condições obtidas nos dois últimos planejamentos experimentais

Tempo (horas)	Raminose (g/L)	Tensão Superficial (dina/cm)	Índice Emulsão (%)	Biomassa (g/L)
24	1,512±0,05	28,0 ± 0,0	70 ± 0,0	2,84 ± 0,35
48	3,392±0,02	26,0 ± 0,0	100 ± 0,0	3,59 ± 0,51

Os resultados mostram que houve reprodutibilidade entre as duas fermentações realizadas e entre os valores obtidos nas condições do Experimento 2 do planejamento fatorial completo (Tabela 4.12). Sendo que os resultados de tensão superficial e índice de emulsificação para 48 horas de fermentação foram os mesmos, a produção de raminose neste experimento foi 4% maior e a quantidade de biomassa de 22% menor. Este resultado era esperado, visto que estes experimentos foram realizados em condições idênticas ao Experimento 2 (Tabela 4.12), porque as condições otimizadas foram às mesmas obtidas neste experimento.

4.11. Regulação e processo fermentativo dos raminolipídeos

A produção de raminolipídeos por Pseudomonas aeroginosa depende de vários fatores nutricionais (fontes de carbono, nitrogênio e sais inorgânicos) e ambientais (temperatura, aeração e pH), (OCHSNER et al., 1995). Em virtude disso, realizaram-se duas fermentações: A primeira fermentação utilizou as melhores condições experimentais definidas no PCC e no Planejamento Fatorial Completo, sem o acréscimo de óleo de soja residual no meio fermentado, com o objetivo de verificar a influência da levedura cervejeira residual como fonte de carbono na produção de biossurfactante. A segunda fermentação utilizou as melhores condições experimentais definidas no PCC e no Planejamento Fatorial Completo, sem a adição dos sais inorgânicos $MgSO_4.7H_2O$, Na_2HPO_4 e KH_2PO_4, com o intuito de verificar a influência dos mesmo na produção de biossurfactantes e o efeito do tamponamento no meio de cultivo.

Os resultados da produção de raminose, índice de emulsificação, tensão superficial e biomassa obtida durante a realização do experimento utilizando as melhores condições obtidas nos dois últimos planejamentos experimentais, sem a presença do óleo de soja residual encontram-se disponíveis na Tabela 4.19.

Tabela 4.19. Resultados médios de produção de raminose, índice de emulsificação, tensão superficial e biomassa obtida durante a realização do experimento utilizando as melhores condições obtidas nos dois últimos planejamentos experimentais, sem a presença do óleo de soja residual

Tempo (horas)	**Raminose (g/L)**	**Tensão Superficial (dina/cm)**	**Índice Emulsão (%)**	**X_0 (g/L)**	**X_f (g/L)**
24	0,0	61,0 ± 2,0	0,0	0,3 ± 0,06	0,84 ± 0,01
48	0,0	61,0 ± 2,0	0,0		1,24 ± 0,01

Nesta fermentação, observou-se que a falta da fonte de carbono (óleo de soja residual) no meio fermentado não propiciou a formação de biossurfactante durante as 48 horas de processo, bem como a formação de emulsão. Quanto à tensão superficial o valor encontrado 61,0 ± 2 dina/cm foi equivalente ao do meio de produção 62 dina/cm. O que sugere a não produção de raminose no meio. Apesar do meio fermentativo possuir outra fonte de carbono (levedura cervejeira residual), o crescimento celular foi pouco expressivo durante as 48 horas de processo, 1,24 g/L (Xf). Isso, provavelmente, se deve a ausência do óleo de soja residual no meio em questão.

Lang & Wullbrandt (1999), afirmaram que para a obtenção de altas concentrações de raminoses o meio de cultivo de Pseudomonas aeruginosa são necessárias, altas relações de carbono e nitrogênio, isto é, excesso da fonte de carbono.

Wullbrandt et al. (1994) com a finalidade de obtenção de L-raminose, realizaram fermentações com mutantes de Pseudomonas aeruginosa DSM 7107 e 7108 e alcançaram a produção de 78 g/L de raminolipídeos, em sete dias de processo, utilizando 125 g/L de óleo de soja, como fonte de carbono. Este fato demonstra a preocupação do autor em utilizar grande concentração de substrato para obter maior produção de biossurfactante.

Na Tabela 4.20 encontram-se os resultados obtidos da produção de raminose, índice de emulsificação, tensão superficial e biomassa obtida durante a realização do experimento utilizando as melhores condições obtidas nos dois últimos planejamentos experimentais, sem a presença dos sais inorgânicos.

Tabela 4.20. Resultados médios de produção de raminose, índice de emulsificação, tensão superficial e biomassa obtida durante a realização do experimento utilizando as melhores condições obtidas nos dois últimos planejamentos experimentais, sem a presença dos sais inorgânicos

Tempo (horas)	**Raminose (g/L)**	**Tensão Superficial (dina/cm)**	**Índice Emulsão (%)**	**X_0 (g/L)**	**X_f (g/L)**
24	0,98	31,0 ± 0,5	60,0	0,3 ± 0,02	1,25 ± 0,01
48	1,86	29,5 ± 0,5	74,0		2,55 ± 0,01

Através da Tabela 4.20, percebeu-se que a falta dos sais inorgânicos constituintes do meio de produção provavelmente prejudicou o crescimento do microrganismo, ocasionando uma baixa produção do raminolipídeo.

Segundo Syldatk et al. (1985) a limitação de cátions (Fe^{+3}, Mg^{+2} e Ca^{+2}) no meio fermentado, os quais são todos essenciais para o crescimento de Pseudomonas, acarretaram um aumento na produção de raminolipídeo, cerca de 25%.

A importância dos íons PO_4^{-3} na produção de raminolipídeos foi demonstrada por Mulligan et al, (1989) que comprovaram uma mudança no metabolismo deste íon, quando ocorria um aumento na produção de raminolipídeos por Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027.

Nesse ensaio, constatou-se um intenso gotejamento de hidróxido de sódio (NaOH 0,01N) durante o processo fermentativo. O que indica que na presença dos sais tem-se um efeito tampão no meio em questão. O volume utilizado nas fermentações em geral foi de 20 mL de base e nessa fermentação consumiu aproximadamente 130 mL da mesma.

Os estudos de Santos (2003) determinaram uma concentração de 62 mmol/L de PO4-3 como ótima para garantir o tamponamento do meio de cultivo, bem como nutriente essencial.

4.12. Ensaios realizados para a produção de raminose utilizando como fonte de carbono óleo de soja in natura (OSN), óleo de soja residual proveniente da fritura de diversos alimentos (OSR) e óleo de soja de frituras em separado de carnes (OSRC), salgados (OSRS) e batatinha (OSRB)

A Tabela 4.21 mostra, nas condições otimizadas (PCC e planejamento experimental fatorial completo), os valores obtidos na síntese de raminose, tensão superficial e índice de emulsão utilizando como fonte de carbono OSN, OSR, e oriundos de frituras em separado OSRC, OSRS e OSRB.

Tabela 4.21. Resultados obtidos para a síntese de raminose, tensão superficial e índice de emulsão utilizando como fonte de carbono OSN, OSR, e oriundos de frituras em separado OSRC, OSRS e OSRB.

Óleo de Soja	Raminose (g/L)	Tensão superficial (dina/cm)	Índice de emulsão (%)
OSN	4,35	26,0	100
OSRC	3,60	28,0	100
OSRS	3,70	27,5	100
OSRB	3,90	27,5	100
OSR	3,26	26,0	100

Na Tabela 4.21, observa-se à diminuição da concentração de raminose quando se utilizou OSRC, OSRS e OSRB, bem como, OSR, quando comparados ao OSN.

Os valores obtidos para as concentrações de raminose foram próximos para os OSRC, OSRS e OSRB.

Utilizando OSR a síntese de raminose foi 25 % menor em relação ao OSN. A concentração de raminose foi maior empregando OSN provavelmente devido ao fato de que, nos óleos vegetais reutilizados, parte dos triglicerídeos foram hidrolisados a ácidos graxos livre (de cadeia curta e média, 4 a 10 carbonos, proporcionando menor valor energético que os triglicerídeos) e a ácidos graxos oxidados, pois, as condições que propiciam a ocorrência de hidrólise de óleos são também responsáveis pela formação de peróxidos, que por sua vez são responsáveis por processos de oxidação que resultam na degradação de vitaminas lipossolúveis (A, D, E K) e de ácidos graxos com produção de substâncias tóxicas (malonaldeído) ou indesejáveis (aldeídos, ácidos graxos cíclicos, cetonas, ácidos, álcoois, epóxidos, hidrocarbonetos, etc.) que trazem como conseqüência final à redução no valor nutricional da gordura (Dobraganes, & Márquez-

Ruiz, 1998) que seria possivelmente utilizada pela linhagem isolada Pseudomonas aeruginosa PALC.

Billek (1985), em seus estudos com óleos aquecidos por longos períodos, sob temperaturas extremamente elevadas, demonstraram que os produtos resultantes contêm mais de 50% de compostos polares, que são os produtos de degradação dos triglicéridios (polímeros, dímeros, ácidos graxos livres, diglicerídeos e ácidos graxos oxidados).

Segundo Jorge (1997) e Sanibal et al (2002) durante o processo de fritura, óleos e gorduras estão expostos à ação de três agentes que contribuem para diminuir sua qualidade e modificar sua estrutura, sendo eles: a umidade proveniente dos alimentos, que é a causa da alteração hidrolítica (o aumento da acidez indica o desenvolvimento de reações hidrolíticas, com a produção de ácidos graxos livres, e conseqüentemente, de diglicerídeos, que ocorreu devido à presença de água e da alta temperatura, pois, quanto maior o percentual de água no alimento, mais rapidamente ela ocorre), o oxigênio do ar, que entra na massa de óleo através da superfície do recipiente possibilitando a alteração oxidativa e, finalmente, a elevada temperatura em que ocorre a operação, por volta de 180 ºC, que provoca a alteração térmica.

O mecanismo das alterações termoxidativas e hidrolíticas de um óleo usado para fritura é complexo, pois depende de uma série de parâmetros, tais como tipo de óleo, tempo e temperatura de fritura, relação superfície/volume do óleo, tipo de aquecimento e natureza do alimento a ser frito. A degradação durante um processo de fritura será tanto maior quanto mais prolongado for o período de utilização do óleo e/ou da gordura e quanto maior for sua insaturação (DOBARGANES et al, 1989; LOLOS et al 1999).

As alterações na composição química do óleo de soja após a fritura de alimentos podem promover diferentes mecanismos de atuação do microrganismo e conseqüentemente interferir na produção de raminolipídeo.

4.13. Extração e purificação de raminolipídeos

Para realizar a extração e a purificação dos raminolipídeos foi necessário recuperá-los do caldo de cultura. Para isso, utilizaram-se os métodos de extração orgânica (clorofórmio/etanol) e de purificação por coluna de adsorção (troca iônica).

Tanto para a extração quanto para a purificação dos raminolipídeos as análises realizadas foram determinadas a partir do meio de cultivo proveniente da fermentação

obtida da melhor condição experimental definida no PCC e no planejamento experimental fatorial completo.

Na Tabela 4.22, encontram-se os resultados de produção de raminolipídeos, índice de emulsificação e tensão superficial obtidos da extração e purificação do meio fermentado após 48 horas de processo.

Tabela 4.22. Resultados de produção de raminolipídeos, índice de emulsificação e tensão superficial obtidos a partir da extração orgânica e coluna de adsorção do meio fermentado após 48 horas de processo

Métodos Analíticos	**Raminose (g/L)**	**Tensão Superficial (dina/cm)**	**Índice Emulsão (%)**
Extração Orgânica	5,29	26,0	100
Coluna de Adsorção	6,8	26,0	100

Através da Tabela 4.22 observa-se que recuperação de raminolipídeos através da coluna de adsorção (troca iônica) se mostrou mais adequada, pois, obteve-se maior concentração de raminose (6,8 g/L). De acordo com Reiling *et al* (1986), a recuperação de tensoativos puros por este método, está em torno de 75%. Verifica-se, também, que a maior concentração de raminolipídeos encontrada, apresentou os mesmos valores para a tensão superficial (26,0 dina/cm) e o índice de emulsificação (100 %), quando comparado ao método de extração orgânica. Isso, possivelmente, deve-se ao fato que a partir de determinadas concentrações de raminolipídeos não ocorre mais influência da tensão superficial e do índice de emulsão do meio fermentado.

Os estudos de Santa Anna (2005) com a cepa *Pseudomonas aeruginosa* PA1 através de fermentação em batelada alimentada de nitrato de sódio, utilizando 3% v/v de glicerol obteve 13,2 g/l de raminolipídeos com redução da tensão superficial para 29 dina/cm. Urum *et al*. (2004) determinaram a tensão superficial com óleo cru, com medida de 28 dina/cm, a partir de uma solução aquosa de raminolipídeo do produto comercial da Jeneil INC.

Haba et al (2002) estudaram as propriedades físico-químicos da mistura de raminolipídeos extraídos e purificados da fermentação com a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* 47T2, crescida de borra oleosa e encontraram em meio aquoso o valor de 32,8 dina/cm para a tensão superficial.

4.14. Cinética e modelagem da produção de raminose, crescimento celular e consumo de nutrientes

Na Figura 4.50, observa-se um intenso crescimento celular até 48 h de fermentação quando a fase estacionária é estabelecida, alcançando uma taxa de produção celular ($Y_{p/x}$) experimental de 0,8 g raminose/g células enquanto o $Y_{p/x}$ calculado pelo modelo foi de 0,73 g raminose/g células. Na 54ª hora, a linhagem isolada atingiu máximos de crescimento (5,04 g/L) e de síntese de raminose (3,34 g/L).

Entre 12 h e 48 h de processo, percebe-se um grande consumo do nitrogênio e fósforo, que aparentemente não influenciaram apenas a produção de biomassa, mas também a síntese de biossurfactante.

É de conhecimento que estas fontes estimulam o crescimento microbiano (Santos, 2002), o que pode indiretamente ter influenciado na produção de raminolipídeo. No final do processo fermentativo foi detectado um consumo de nitrato de aproximadamente 65%. Assim, a interrupção do processo de crescimento e produção de raminose, observados na Figura 4.50, pode ser atribuída a uma limitação de carbono para metabolismo bacteriano. Normalmente, a relação de carbono/nitrogênio é importante ao rendimento de qualquer produção de moléculas bioativas (REIS *et al,* 2004; OCHSNER *et al*, 1996; SANTOS *et al*, 2002; MERCADÉ *et al*, 1993 e DESAI *et al,* 1993). A fonte de nitrogênio, em associação com disponibilidade de carbono, favorece a manutenção do processo enzimático necessário para a síntese de raminose (Ochsner *et al.*, 1995). Além disso, o final do processo fermentativo pode estar relacionado à formação de subprodutos tóxicos, ou seja, pela solubilidade de componentes tóxicos constituintes do óleo de soja residual pela acumulação de biossurfactante no meio.

De acordo com a Figura 4.50, a síntese de biossurfactante findou no início da fase estacionária, sugerindo ser a produção associada ao crescimento celular. Rahman *et al.*(2002) verificaram que inicialmente a produção de biossurfactante acompanhava a fase de crescimento microbiano. Porém, quando o crescimento microbiano cessou, entrando na fase estacionária, houve continuidade da síntese da raminose caracterizando uma produção de biotensoativos semi-associada ao crescimento microbiano, em tempo de fermentação de 260 horas, ou seja, muito superior às 96 h determinadas neste trabalho.

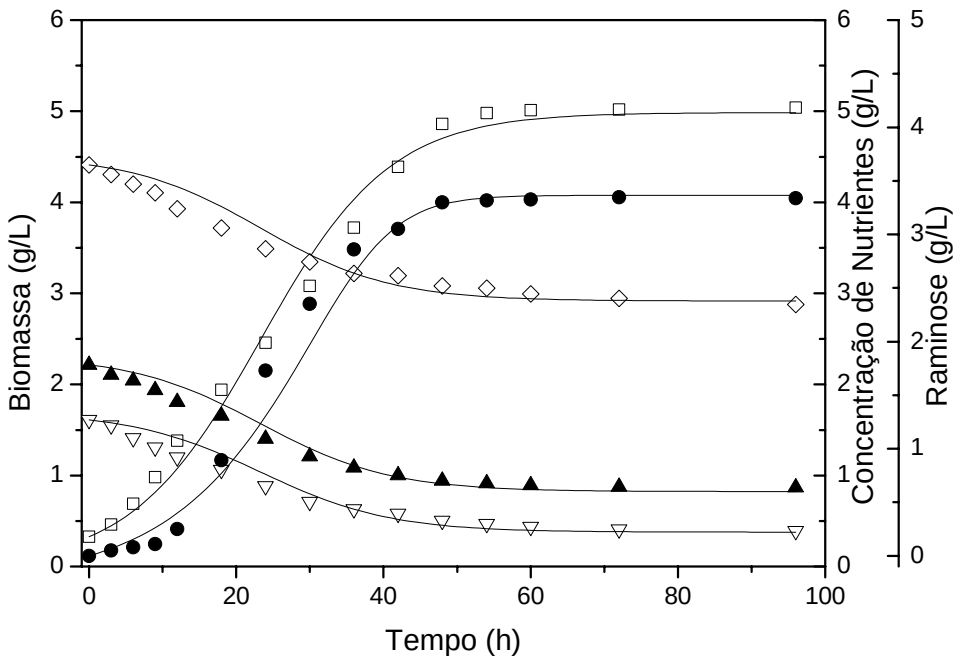


Figura 4.50. Evolução ao longo do tempo das concentrações de biomassa (□), nitrato (◇), Fósforo total (▲), Nitrogênio Kjeldahl total (▽), e Raminose (•) durante o cultivo da *Pseudomonas aeruginosa* PALC em biorreator usando uma taxa de aeração 0,5 vvm e velocidade de agitação de 555 rpm. Os símbolos representam os resultados experimentais e as linhas, os dados resultantes do modelo cinético descrito pelas equações de (3.11) a (3.15).

A identificação paramétrica foi obtida utilizando os dados experimentais e seguindo o procedimento descrito em 3.7.1 em materiais e métodos. O modelo foi constituído pelas Equações de (3.13) a (3.18), sendo uma equação algébrica e cinco equações diferenciais. Os valores dos paramentos estão apresentados na Tabela 4.22.

Nas equações que descrevem a produção de raminose (3.14) e os consumos de nitrato (3.15), fósforo (3.16) e nitrogênio total (3.17) os termos de manutenção e de produto não associado ao crescimento foram desprezados, pois, o ajuste dos parâmetros do modelo indicou valores desprezíveis para os mesmos, demonstrando que o processo de produção de biossurfactante por esta linhagem nas condições nutricionais testadas foi associada ao crescimento celular.

O ajuste paramétrico apresentou boa correlação entre os valores experimentais e os fornecidos pelo modelo como mostram os desvios (menores que 4,23%) calculados para os parâmetros ajustados e apresentados na (Tabela 4.23).

Tabela 4.23. Valores dos parâmetros obtidos pelo ajuste paramétrico

Parâmetros de consumo e produção	**Valor ± (desvio)**	**Parâmetros de crescimento**	**Valor ± (desvio)**
α (g NO_3/g biomassa/h)	0,321 ± (0,012)	μ_{max} (1/h)	0,114 ± (0,002)
β (g *Pt*/g biomassa/h)	0,299 ± (0,012)	X* (g *X*/L)	4,986 ± (0,060)
γ (g *NKt*/g biomassa/h)	0,265 ± (0,012)	-	-
λ (g Ram/g biomassa/h)	0,734 ± (0,014)	-	-

Os valores dos rendimentos determinados pelo modelo (Y mod) foram comparados com os rendimentos experimentais (Yexp) e os resultados indicaram valores de rendimentos de conversão dados pelo modelo, foram próximos àqueles obtidos experimentalmente como podem ser verificados na Tabela 4.24.

Tabela 4.24. Comparação dos rendimentos experimental (Yexp), e rendimento dado pelo Modelo (Ymod) para a conversão de nitrogênio Kjeldahl total, fósforo total, e nitrato em biomassa (X)

Rendimento	**(g X/g NO_3^-)**	**(g X/g Ptotal)**	**(g X/g NKjeldahl total)**	**(g Ram/g células)**
Yexp	3,178	3,496	3,869	0,73
Ymod	3,311	3,345	3,802	0,8

O modelo obtido permite estimar o desempenho do processo nas condições estudadas experimentalmente e predizer o nível provável de produção de raminose. O domínio de validade define os limites de utilização deste modelo que são as condições realizadas no experimento. Com os parâmetros do modelo, estudos de simulação podem ser realizados para verificar o consumo seqüencial da composição de nitrato, fósforo e de nitrogênio.

4.15. Validação do modelo cinético realizado em reator de 3 litros

O modelo com parâmetros estimados utilizando dados obtidos no reator de 6 litros foi utilizado na predição dos valores experimentais obtidos no reator de 3 litros, apresentando uma boa concordância conforme demonstrado nas Fig.4.50 e Fig.4.51..

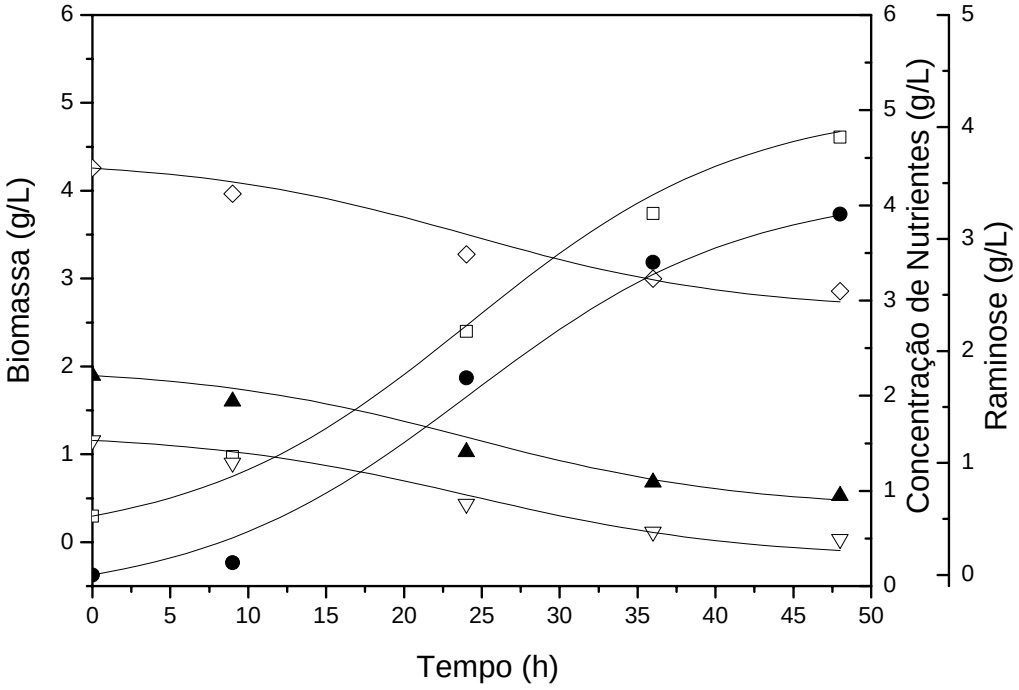


Figura 4.51 - Evolução ao longo do tempo das concentrações de biomassa (□), nitrato (◇), Fósforo total (▲), Nitrogênio Kjeldahl total (▽), e Raminose (•) durante o cultivo da *Pseudomonas aeruginosa* PALC em biorreator (3 litros) usando um a taxa de aeração 0,5 vvm e velocidade de agitação de 555 rpm. Os símbolos representam os resultados experimentais e as linhas, os dados resultantes do modelo cinético descrito pelas equações de (3.11) a (3.15).

A evidência de que a condição otimizada no reator de 6L pudesse ser reproduzida no reator de 3L foi devida à utilização das mesmas condições de concentrações de inoculo, substrato, nutrientes, agitação, aeração e transferência volumétrica de oxigênio dissolvido em ambos os reatores. O experimento cinético não foi realizado no reator de 3 litros, pois a retirada de amostras poderia comprometer o volume do meio reacional e conseqüentemente o desempenho do processo.

A transferência de oxigênio para as mesmas condições experimentais nos dois reatores foram equivalentes (K_La=10,2 h^{-1} no reator de 3 L e K_La=10,4 h^{-1} no reator de 6 L) o que levou à realização do experimento cinético no reator de 6 L. Além disso, os parâmetros descritos pelo modelo para as equações 3.13 a 3.17 obtidas no reator de 6 L, foram usadas na validação dos valores experimentais obtidos no reator de 3L, verificando-se que o modelo prediz com boa acuidade os resultados nestas condições, conforme mostra a Figura 4.51.

Nota-se nas Figuras 4.50 e 4.51 e na Tabela 4.12 que para o mesmo tempo de reação (48horas – tempo utilizado para a determinação da condição de otimização) os valores de crescimento celular (4.61 g/L no reator de 3L e 4.8 g/L no reator de 6L) e de produção de raminose (3.26 g/L no reator de 3L e 3.24 g/L no reator de 6L) são próximos. Assim o modelo estudado teve bom desempenho, conseguindo retratar os resultados na diferente condição de escala estudada.

CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho podem-se enunciar as seguintes conclusões:

- A metodologia do planejamento experimental apresentou-se como uma ferramenta muito útil e aplicável para determinar o comportamento das variáveis independentes sobre a produção de raminose, tensão superficial, índice de emulsificação e crescimento celular, evitando análises excessivas e apresentando informações generalizadas sobre a influência dos parâmetros independentes no processo;
- As linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e PALC apresentaram potencial para produzir biossurfactante;
- Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a *Pseudomona aeruginosa* isolada PALC proporcionou melhores respostas em termos de produção de raminose, tensão superficial e índice de emulsificação, sendo, portanto, selecionada para os demais experimentos realizados neste estudo;
- Todos os experimentos testados foram capazes de produzirem compostos que propiciaram a formação de emulsões estáveis por 24 horas;
- A otimização das respostas analisadas mostrou que os melhores resultados encontrados para a concentração de raminose, tensão superficial e índice de emulsão foram em torno de 22,0 g/L para o óleo de soja residual, 5,7 g/L para o nitrato de amônio e 11 g/L para a levedura cervejeira residual;
- A *Pseudomonas* PALC, a partir das condições otimizadas, 0,5 vvm (K_La 10,2 h^{-1}) e 555 rpm, produziu 3,26 g/L de raminose, 26 dina/cm para tensão superficial e 100 % de emulsificação;
- Através da recuperação e purificação de raminolipídeos utilizando a coluna de adsorção (troca iônica), obteve-se maior concentração de raminose (6,8 g/L);
- Os parâmetros descritos pelo modelo cinético para a produção de raminose, consumo de fósforo e nitrogênio total obtidas no reator de 6 L, foram usadas na predição dos valores experimentais obtidos no reator de 3L, verificando-se que o

- Modelo se ajustou aos dados experimentais;
- O estudo demonstrou ser possível utilizar matéria prima que são lançadas ao meio ambiente, como resíduo, na produção de biossurfactante.

CAPÍTULO 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Sabe-se pelos estudos bibliográficos que a linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* mantém-se ativa em uma faixa muito ampla de pH (4 a 10) e que o mesmo influência significativamente na produção de biossurfactante (HOROWITS et al., 1991, MAKKAR & CAMEOTRA, 1997, PERSSON et al. 1988, DEL'ARCOS, 1999, FERREIRA, 1999). Em virtude disso, propõe-se realizar ensaios no reator, variando o pH em 5,0, 6,0 e 8,0 mantendo-se constante as demais variáveis (temperatura, agitação e aeração). Este estudo poderá ser realizado nas condições operacionais otimizadas.

- Neste estudo foi determinada a importância da adição de nitrogênio no meio de produção (2° planejamento), para síntese de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* PALC. Assim, propõe-se testar outras duas fontes de nitrogênio, sendo elas: $NaNO_3$ e $(NH_4)_2SO_4$ encontradas na literatura (MERCADÉ *et al*., 1992, MAKKAR *et al*., 1996, TURKOVSKAYA *et al.*, 1999, KIM *et al*., 1999, ABALOS *et al*., 2000, SANTA ANNA *et al*., 2001, SANTOS *et al*., 2002). Poderá ser mantidas as condições operacionais selecionadas anteriormente, e estas fontes serão testadas na mesma concentração de nitrogênio otimizado.

- Caracterizar a estrutura molecular do raminolipídeo e determinar sua quantidade produzida;

- Determinar a cinética de consumo de substrato durante as 48 horas de processo fermentativo;

- Aplicar o biossurfactante produzido em planta de recuperação de petróleo ou em processo de biorremediação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALOS, A., PINAZO, A., INFANTE, M. R. CASALS, M., GARCIA, F., MANRESA, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from oil refinery wastes. Langmuir, v. 17, p. 1367-1371, 2001.

ANDRÉS, C.; MERCADÉ, E.; GUINEA, J.; MANRESA, A. 7,10-Dihydroxy-8 (E) – octadecanoic acid produced by *Pseudomonas* 42 A2: evaluation of different cultural parameters of the fermentation. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 10: p.106-109, 1994.

ANGGRAINI-SÜß: Reprocessing of used vegetable oil as fuel for diesel engines or heaters. Artigo apresentado no I Congresso Brasileiro-Alemão para Energias Renováveis, Fortaleza, setembro de 1999.

ARIMA, K., KAKINUMA, A., TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of Fibrin clot formation. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.31, n.3, 1968.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS (ABIOVE). Complexo soja no Brasil em 2007, São Paulo. Disponível em (http://www.abiove.com.br). Acesso em: 14 abril 2007.

BABU, K.S.; AJITH-KUMAN, P.V.; KUNHI, A.A.M. Simultaneous degradation of 3-chlorobenzoate and phenolic compounds by a defined mixed culture of *Pseudomonas aeruginosa* ssp. World Journal of Microbial & Biotechnology, v. 11, p. 148-152, 1995.

BAILEY, J. E., & OLLIS, D. F.. Biochemical Engineering Fundamentals, second edition, McGraw-Hill, Singapore, pp. 404, (1986).

BANAT, I. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. Biotechnology Letters, v.15, n.6, p.591-594, 1993.

BANAT, I.M., SAMARAH, N., MURAD, M., ROENE, R., BANERJU, S. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.7, p.80-88,1991.

BANAT, I. M. Biosurfactant production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. Bioresearch Technology, 51: 1-12, 1995.

BANAT, I. M.; Biosurfactant. v. 41, p. 198, 2000.

BANAT, I. M., RHAMAN, K. S. M., RHAMAN, T. J., MARCHANT, R., MCCLEAN, S. Rhamnolipid bi8osurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. Biotechnology Prog. v. 18, p. 1277-1281, 2002.

BATISTA, E., MONNERAT, S., KATO, K., Liquid–Liquid Equilibrium for Systems of Canola Oil, Oleic Acid, and Short – Chain Alcohols, J. Chem. Eng. Data, v.44, n.6, p.1360 – 1364, 1999.

BENINCASA, M., CONTIERO, J., MANRESA, M. A., MORAES, I. O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. Journal of Food Engineering 54 p. 283-288, 2002.

BERNHEIMER, A.W., AVIGAD, L.S. Nature and properties of cytological agent produced by *Bacillus subtilis*. Journal of General Microbiology, v. 61, p.361-369, 1970.

BERTRAND, J.C., BONIN, P., GOUTX, M., GAUTHIER, M., MILLE, G. The potential application of biosurfactants in combatting hydrocarbon pollution in marine environments. *Research in Microbiology*, v.145, n.1, 1994.

BILLEK.G. Heated fats in the diet. In: PADLEY, F. B.; PODMORE. J (Eds). The role of fats in human nutrition. Chichester: Ellis Horwood, cap. 12, p. 163-172, 1985.

BIODIESEL BRASIL. Em casa e nas escolas. Departamento. de Química - USP/RP. Ribeirão Preto-SP n. 274, 2007. Disponível em www.biodieselbrasil.com.br. Acesso em 25 julho.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents of hydrocarbons. Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 152: 41 - 52, 1999.

BODOUR, A. A., DREES, K. P., MAIER, M. R. Distribution of Biosurfactant-Producing Bacteria in Undisturbed and Contaminated Arid Southwestern Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 6, p. 3280–3287, 2003.

BOULTON, C. A., RATLEDGE, C. Biosynthesis of lipid percursors to surfactant production. Biosurfactants and Biotechnology, New York (USA): Ed. KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L. & GRAY, N. C. C.; DEKKER, M. Inc., p. 47 - 87, 1987.

BOX, G. E. P. HUNTER, W. G., HUNTER, T.S. Statistics for Experimenters. United States of America and Canada, John Wiley & Sons, Inc., 1978.

BRADY, J.E., HUMISTON,G.E. Química Geral. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1ª ed, 1981.

CABALLERO-CÓRDOBA, G.M.; PACHECO, M.T.B.; SGARBIERI, V.C. Composição química de biomassa de levedura integral (*Saccharomyces cereveisiae*) e determinação do valor nutritivo da proteína, em células íntegras ou rompidas mecanicamente. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 17, n. 2, p. 102-106, 1997.

CABRAL FILHO, S.L.S. Avaliação do resíduo de cervejaria em dietas de ruminantes através de técnicas nucleares e correlatadas. Piracicaba, 1999.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. Applied microbiology and Biotechnology, v. 50, p. 520-529, 1998.

CAMERON, D. R., COOPER, D. G., NEUFELD, R. J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective biomulsifier. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 54, n. 6, p. 1420-1525, 1988.

CIRIGLIANO, M. C., CARMAN, G. M., Isolation of a Bioemulsifier from *Torulopsis lipolytica*. Applied end Environmental Microbiology, Vol. 48, n. 4, p. 747-750, 1984.

COOPER, D.G., MACDONALD, C.R., DUFF, S.J., KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. Applied and Environmental Microbiology, v.42, n.3, p.408-412, 1981.

COOPER, D.G., PADDOCK, D.A. *Torulopsis petrophilum* and surface activity. Applied and Environmental Microbiology, v.46, n.8, p.1426-1429, 1983.

COOPER, D.G., PADDOCK, D.A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. Applied and Environmental, v.47, n.1, p.173-176, 1984.

COOPER, D.G., ZAJIC, J.E. Surface-active compounds from microorganism. Advances in Applied Microbiology, v.26, p.229 - 252, 1980.

CHRISTOFI, N., IVSHIRA, I. B. Microbial and their use in field studies of soil remediation. Journal Applied Microbiology. V. 93, p. 915-929, 2002.

DAVILA, A., MARCHAL, F., VANDECASTEELE, J. Kinetics and balance of fermentation free product inhibition sophorose lipid production by *Torulopsis bambicola*. Apllied and Microbiology Biotechnology, n. 38, p. 6-11, 1992.

DE LUNA, M. J., RUFINO, D. R., DE GUSMÃO, A. C., SARUBBO, A. L., TAKAKI, M. G. Produção de biosurfactante por *Candida glabrata* utilizando óleo de algodão como substrato. SINAFERM XV Simpósio Nacional de Bioprocessos - Recife, 2005.

DE ROUBIN, MR, MULLIGAN, C. N., GIBBS, F. G., Correlation of enhanced surfactin production with decreased isocitrate dehydrogenase activity. Canadian Journal of Microbiology, Vol. 35, p. 854-859, 1989.

Desai, J.D. Microbial surfactants: evaluation, types, production and future applications. Journal of Science and Industrial Research, v.46, p.440-449, 1987.

Desai, J.D., Banat, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v.61, n.1, p.47-64, 1997.

DESHPANDE M., DANIELS, L. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal. Bioresource Technology. Vol. 54, p. 143-150, 1995.

DEZIEL, E.; LÉPINE, F.; DEMRIE, D.; BOISMEN, D.; MAMER, O.A.; VILLEMUR, R. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. Biochemical et Biophysical Acta, v. 1440, p. 244-252, 1999.

DÉZIEL, E.; PAQUETE, G.; VILLEMUR, R.; LÉPINE, F. BISAILLON, J.G. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. Applied and Environmental Microbiology, v. 62, n. 6, p. 1908-1912, 1996.

DOBARGANES, M.C., MÁRQUEZ-RUIZ, G. Regulation of used frying fats and validity of quick tests for discarding the fats. Grasas Aceites, Sevilla, v.49, n.3/4, p.331-334, 1998.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, v. 28; n. 3, p. 350-356, 1956.

DUVNJAK, Z., COOPER, D.G., KOSARIC, N. Production of surfactant by *Arthrobacter paraffineus* ATCC19558. Biotechnology and Bioengineering, v.24, p.165-175, 1983.

DUVNJAK, Z., KOSARIC, N. Production and release of surfactant by *Corynebacterium lepus* in hydrocarbon and glucose media. Biotechnology Letters, v.7, n.11, p.793-796, 1985.

ESPUNY, M. J., EGIDO, S., MANRESA, I. R. A., MERCADÉ, M. E. Nutritional requerements of a biosurfactant producing strain *Rhodococcus* sp. 51t7. Biotechnology Letters, Vol. 18, n. 5 p. 521-526, 1996.

FARIA, A. A.; LELES, M. I. G.; IONASHIRO, M., et al. Estudo da Estabilidade Térmica de Óleos e Gorduras Vegetais por TG/DTG e DTA, Ecl. Quím, São Paulo, v. 27, p. 111-119, 2002.

FLASZ, A. ROCHA, C. A., MOSQUERA B., SAJO, C. A comparative study of the toxicity of a synthetic surfactant and one produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925, Medical Science Research. v. 26, p. 181–185, 1998.

FERNANDES, F. S., REIS-COSTA, L., KRONKA A. M., COPPEDE, J. S., BENINCASA, M. Aproveitamento de resíduos gerados no refino de óleos vegetais para a produção de biossurfactantes. SINAFERM XV Simpósio Nacional de Bioprocessos - Recife, 2005.

FIECHTER, D. Biosurfactants: moving towards industrial application. Trends in Biotechnology, v.10, p. 208-216, 1992.

FOX, S. L., BREHM, M. A., ROBERTSON, E. P., JACKSON, J. D., THOMAS, C. P., BALA, G. A. Comparitive analysis of microbially madiated oil recovery by surfactants produced by *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. In: Premuzic, E. T., Woodhead, A. (Eds.), Developments in Petroleum Science. Elsivier, New York, p. 143 - 150, 1993.

FRANCY, D.S., THOMAS, J.M., RAYMOND, R.L., WARD, C.H. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. Journal of Industry Microbiology, n.8, p.237-246, 1991.

FURCO, A. M. Produção de biomassa de levedura em destilarias de álcool. In: Anais do workshop sobre produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, p.52-58, 1996.

GEORGIOU, G., LIN, SC, SHARMA, M.M. Surface-active compounds from microorganisms. Biotechnology, v. 10, p. 60-65, 1992.

GERSON, D. F. Biosurfactantes: production - properties - applications. Editado por Naim Kosaric. 269 - 286, 1993.

GIESE, J. Fats, Oils, and Fat Replaces. Food Technology - Especial Repot, 1996.

GOBBERT, U., LANG, S., WAGNER, F. Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulopsis bombicola*. Biotechnology Letters, n. 6, p. 225-230, 1984.

GONÇALVES, C.; BATISTA, E.; MEIRELLES, A.J.A. Liquid–Liquid Equilibrium Data for the System Corn Oil + Oleic Acid + Ethanol + Water at 298.15 K, J. Chem. Eng. Data, v.47, n.3, p.416 – 420, 2002.

GUERRA-SANTOS, L., KAPPELI, O., FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuos culture with glucose as carbon source. *Apllied and Environmental Microbiology*, Vol. 48, n. 2, p. 301-305, 1984.

GREAVES, K. A., WILSON, M. D., RUDEL, L. L., WILLIAMS, J. K., WAGNER, J. D. Consumption of Soy Protein Reduces Cholesterol Absorption Compared to Casein Protein Alone or Supplemented with an Isoflavone Extract or Conjugated

Equine Estrogen in Ovariectomized Cynomolgus Monkeys. *J. Nutr.* 130: 820-826, (2000).

HABA, E., ESPUNY, M. J., BUSQUETS, M., MANRESA, A. Screening and production if rhamnolipidis by *Pseudomonas aeruginosas* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oil. J. Appl. Microbiol. Vol. 88 p. 379-387, 2000.

HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. Use of yeast biomass in food production. CRC Press, Boca Raton, 1991.

HAUSER G., and M. L. KARNOVSKY, Fed. Proc. Vol 16, p. 193- 210, 1957. HELENIUS, A. E SIMONS, K., Solubilization of membranes by detergents. Biochimistry. Biophys. Acta, 415, 29-79, 1975.

HELENIUS, A., SIMONS, K., Solubilization of membranes by detergents. Biochemica et Biophysica Acta. Amsterdam, v.415. p.29-79, 1975.

HIDALGO, F.J.; ALAIZ, M.; ZAMORA, R. Determination of Peptides and Proteins in Fats and Oils, *Anal. Chem.*, v.73, n.3, p.698–702, feb. 2001.

HINZEL, W. L.; Solution Chemistry of Surfactants, Mittal, K. L., ed., Plenunn Press: New York, 1979.

HIRAYAMA, T., KATO, I. Novel rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa*. FEBS Letter, n. 139, p. 81-85, 1982.

HOMMEL, R.K. Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon utilizing microorganisms. Biodegradation, v.1, p.107-119, 1990.

HOROWITZ, S., GILBERT, I. N., GRIFFIN, W. M., Isolation and characterization of a surfactant produced by Baccilus licheniformis. Journal of Industrial Microbiology, Vol. 6, p. 243-248, 1990.

IRVINE, T.S. Laboratory fermenters *In: Fermentation: apractical approach*, Ed. B. McNeil &L.M. Harvey. Oxford University Press, p 17-38, 1990.

ITOH, S., INOUE, S. Sophorolipds from *T*orulopsis bombicola: possible relation to alkane uptake. Applied and Environmental Microbiology, n. 43, p. 1278-1283, 1982.

ITOH, S. and T. SUZUKI. Effect of rhamonolipids on growth of *Pseudomonas aeruginosa* mutant deficient in n-paraffin-utilizing ability. Agric. Biol. Chem. 36: 2233 - 2235, 1971.

JAIN, D. K. THOMPSON, D. L. C., LEE, H., TREVORS, J. T. A drop-collapsing test for screening surfactant producing microorganisms. Journal of Microbiology Methods, n. 13, p. 271-279, 1992.

JAVAHERI, M., JENNEMAN, G. E., MCINERNEY, M. J., KNAPP, R. M., Anaerobic production of a biosurfactant by *Baccilus licheniformis* JF-2. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 50, n.3, p. 698-700, 1985.

KANTIN, R. Poluição aquática por detergentes: aspectos gerais. Rio de Janeiro: Engenharia Sanitária, v. 19, n. 1, p. 82-85, 1980.

KAPPELI, O., MÜLLER, M., FIECHTER, A. Chemical and structural alterations at the cell surface of *Torulopsi tropicalis* induced by hydrocarbon substrate. Journal of Bacteriology, v. 133, p. 952-958, 1986.

KAPPLAN, N., ROSENBERG, E. Exopolysaccharide distribution of and biomulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413. Apllied and Environmental. Vol. 44, n. 6, p. 1335-1341, 1982.

KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G., VEENANADING. Microbial production of biosurfactants and their importance. *Current Science*, v. 77, p. 116 - 126, 1999.

KIM, S. H., LIM, E. J., LEE, J. D., LEE, T. H. Purification and charaterization of biosurfactants from *Nocardia sp*. L-417. Biotechnology Applied Biochemistry. Vol. 31, p. 249-253, 2000.

KINSELLA, J.E.; SHETTY, H.J. Yeast protein recovery, nutritional and functional properties. Advances in Experimental Medicine and Biology, v. 107, n. 5, p. 97-825, 1978.

KITAMOTO, D., YANAGISHITA, H., SHINBO, T., NAKANE, T., KAMAISAWA, C., NAKAHARA, T. Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antartica*. Journal of Biotechnology, n. 29, p. 91-96, 1993.

KIYOHARA, H; NAGAO, K; YANA, K. Rapid screen for bacteria degrading water insoluble solid hydrocarbons on agar plates. Applied and Environmental Microbiology, v.13, p.257-266, 1982.

KOCH, A.K.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A.; REISER, J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in Pseudomonas aeruginosa mutants. Journal of Bacteriology, v. 173, n. 13, p. 4212-4219, 1991.

KOSARIC, N., GRAY, N.C.C., CAIRNS, W.L. Microbial emulsifiers and de-emulsifiers. In: Rehm, H. J., Reed, G. (eds). Biotechnology, v. 3, cap. 3i, p. 576-591, 1983.

KOSARIC, N., GRAY, N.C.C., CAIRNS, W.L., STECHEY, D., WOOD, J. The role of notrogen in multiorganism strategies for biosurfactan production. JAOCS, Vol 61, n. 11, 1987.

LANG, S.; WAGNER, F. Structure and properties of biosurfactants. *In:Biosurfactants and Biotecnology*, ed. N. Kosaric, W.L. Cairns & N.C.C. Gray. Marcel Dekker, New York, NY, pp 1-21, 1987.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnose lipid – Biosynthesis, Microbial Production and Application Potenctial. Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 51, p. 22-32, 1999.

LEE, K., KIM, J. H. Distribuition of substrates carbon in sophorose lipid production by *Torulopsis bombicola*. *Biotechnology Letters*, Vol. 15, n. 3, p. 263-266, 1993.

LEGISLAÇÃO, Resolução CNNPA nº. 20/77, DOU de 26/07/1977. Disponível em http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public. Acesso em 21 janeiro 2007.

LICHTENBERG, D., ROBSON, R.J. E DENNIS, E.A., Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects. Biochim. Biophys. Acta, 737, 285-304, 1983.

LIN, S.C. Biosurfactants: recent advances. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.66, p. 109-120, 1996.

LIN, SC, CARSWELL, K. S., SHARMA, M. M., GEORGIOU, G. Continuous production of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* LF-2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 41, p. 281-285, 1994.

LINHARDT, R.J.; BAKHIT, R.; DANIELS, L.; MAYERL, F.; PICKENNHAGEN, W.

Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 33, p. 365-368, 1989.

LIZ, Y. LANG, S. WAGNER F. WITTE L., and V. WRAY, Appl. Environ. Microbiol. Vol. 48, p. 610, 1984.

LUCAS, E. F. Tensoativos. Seminário de Mestrado Mmp-751. Rio de Janeiro: Instituto de Macromoléculas, UFRJ, 1988.

LUEDEKING, R., & PIRET, E. L. A kinetic study of the lactic acid fermentation: batch process at controlled pH. *J. Biochemistry Microbiology Technology Engineering,* 1, 393-412, (1959).

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Brock Biology of Microorganisms, 10th edition, Prentice Hall/Pearson Higher Education Group, Upper Saddle River, NJ. ISBN 0-13-066271-2, 2003.

MAKKAR, R. S., CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. Journal of Industrial Biotechnology, v.18, p.37-42, 1997.

MAKULA, R. A., FINNERTY, W. R., Microbial assimilaton of hydrocarbons: cellular distribuition of fatty acids. *Journal of Bacteriology*. Vol. 112, n. 1, p. 398-407, 1972.

MARGARITIS, A., KENNEDY, K., JASIC, J. E., GERSON, D. F. Biosurfactant production by *Nocardia erythropolis*. *Development of Industrial Microbiology*. N. 20, p. 623-630, 1979.

MARQUARDT, D. W. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *Journal of the Society for Industrial and Applied*, 11, 431-441, 1963.

MATA-SANDOVAL, J. C., TORRENTS, A. High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by pseudomonas aeruginosa UG2 on corn oil. J. Chromatography, v. 864, n. 2, p. 211-20, 1999.

MATSUFUJI, M.; NAKATA, K.; YOSHIMOTO, A. High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol. *Biotechnology Letters*, v.19, n.12, p.1213-1215, 1997.

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

MERCADE, M. E. Prodducción de biotensioactivos a partir de las aguas residuales de as amazaras, PhD thesis, Universuty of Barcelona, Spain, 1990.

MERCADE, M. E. and MANRESA, M. A. The use of agroindustrial by products for biosurfactant production. Journal American Oil Chemical Society, v. 71, p. 61 - 64, 1994.

MERCADÉ, M. E.; MANRESA, M. A.; ROBERT, M.; ESPUNY, M. J.; DEANDRES, C. and GUINEA, J. Olive oil mill effluent (Oome) - mew substrate for biosurfactant production. Biores. Technology, v. 43, p. 1 - 6, 1993.

MESQUITA, A. C. Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes. Dissertação de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

MITTELBACH, M. Production and Fuel Properties of Fatty Acid Methyl Ester from used Frying Oil. In : Liquid Fuels from Renewable Sources. Nashville, Tennesse, 1992.

MITTELBACH, M.: The importance of diesel fuel substitutes from non-edible seed oils, janeiro de 2000. Disponível em http://www.balu.kfunigraz.ac.at/~mittelba/ . Acesso em 26 julho 2007.

MITTELBACH, M., TRITTHART, P: Diesel fuel derived from vegetable oils, III. Emission tests using methil esters of used frying oil. v. 65, n 7, p. 1185-1187, 1988.

MONTEIRO, A. S., ASSAKI L. G., DE RARAÚJO, M. J., MITCHEL, A. D., KRIEGER, N., LANZIERI, B. N. Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* daupe 614. SINAFERM XV Simpósio Nacional de Bioprocessos - Recife, 2005.

MORETTO, E.; ALVES, R.A. Óleos e gorduras vegetais: processamento e análises. Ed. da UFSC, Florianópolis-SC,179 p, 1986.

MORETTO, E., FETT, R. Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais. São Paulo: Varela, 1998. 150p.

MORETTO, E., FETT, R., GONZAGA, L.V. et al. Introdução à Ciência de Alimentos. Florianópolis: UFSC, 2002. 255Pp.

MORIKAWA, M., DAIDO, H. A new lipopeptide biosurfactant produced by Arthrobacter sp. Strain MIS38. Journal of Biotechnology, p. 6459-6466, 1993.

MORIKAW.A, M., HIRATA, Y. IMANAKA, T., A study on the struture-function ralationship of lipopeptide biosurfactants. Biochimica et Biophysica Acta 1488 p.211-218, 2000.

MULLIGAN, C. N. Environment applications for biosurfactants. *Environmental Polluition*, 133, 183-198, 2004.

MULLIGAN, C. N., MAHMOURIDES, G., GIBBS, B. F. Biosurfactant production by a chloramphenicol tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Biotechnology, Vol. 12, p. 37-44, 1989.

NAVON-VENEZIA, S., ZOSIM, Z., GOTTLIEB, A., LEGMANN, R., CARMELI, S., RON, E. Z., ROSENBERG, E. Alasan, a new biomulsifier from Acinetobacter radioresistents, Applied and Environmental Microbiology, v.61, n. 9, p. 3240-3244, 1995.

NEUZA, J., SOARES B. B. P., LUNARDI, V. M., & MALACRIDA, C. R. Alterações físico-químicas dos óleos de girassol, milho e soja em frituras. Química Nova, vol. 28, no.6. São Paulo, 2005.

NITSCHKE, M. & PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. Química Nova, 25: 772 - 776, 2002.

NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985). Métodos químicos e físicos para análises de alimentos, 1, 317-319.

OBERBREMER, A., MULLER-HURTIG, R., WAGNER, F. Effect of the addition of microbial surfactant on hidrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. Applied Microbiology Biotechnology, n. 32, p. 485-489, 1990.

OCHSNER, U. A., REISER, J. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 6424 - 6428, 1995.

OHNO, A., ANO, T., SHODA, M. Production of a lipopeptide antibiotic surfactin by recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation Biotecnology and Bioengineering, v. 47, p. 209-214, 1995.

PALEJWALA, S., DESAI, J. D. Production of an extracellular emulsifier by a Gram-negative bacterium. Biotechnology Letters, 11(2), 115-118, 1989.

PARENTE, E. J. de SÁ. Biodiesel: Uma Aventura Tecnológica num País Engraçado. Fortaleza, 2003. Disponível em: http://www.tecbio.com.br/Downloads/Livro. Acesso em 27 julho 2007.

PARRA, J.L., GUINEA, J., MANRESA, M.A. Chemical characterization and physico-chemical behavior of biosurfactants. Surfactants and Detergents Technical. JAOCS, 66(1), 1989.

PATEL, R.M., DESAI, A.J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GSB from molasses. *Letters in Applied Microbiology*, v.25, p.91-94, 1997.

PEIXOTO, N. Processamento de produtos de biomassa de levedura para alimentação humana: potencial, mercado interno e extreno. In: Anais do workshop sobre produção de biomassa de levedura – utilização em alimentação humana e animal, Campinas, SP, p.90-98, 1996.

PELCZAR, M. J. J. CHAN, E. C. S., KRIEG, N. R. Microbiology Concepts and applivations, 5 Ed. New York. Ed. McGraw-Hill, inc. 1993.

PELIZZETTI, E. PRAMAURO, E. Analysis Chemical. Acta, 1985, 169, 1.PERSON, A.; MOLIN, G. Capacity of biosurfactant production og environment Pseudomonas and Vibrionacea growing on carbohidrates. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 26, p.439-442, 1987.

PERSSON, A, Osterberg, E., Dostalek, M. Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* 378: growth and product characteristics. Applied Microbiology and Biotechnology, v.29, p.1-4, 1988.

PINNHEIRO-ROBERG, R.A. Aproveitamento de efluentes industriais para a produção de biomassa entomopatogênica à base Bacillus sphaericus. Orientador: Eliana Flavia Camporese Sérvulo. Rio de Janeiro, EQ/UFRJ, Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), 2000.

PORTAL DA SECRETARIA DA AGRICULTURA FAMILIAR. Descrição do processo de produção de Soja. Ministério do Desenvolvimento Agrário, Brasília, 2007. Disponível em (www.pronaf.gov.br). Acesso em: 21 março 2007.

PORTER, M.R. Handbook of surfactants. New York: Chapman & Hall, 2ª ed., 1994.

PROGRAMA COLETA DE ÓLEOS DE FRITURA. Laboratório de Desenvolvimento de Tecnologias Limpas. Ribeirão Preto – São Paulo, 2006. Disponível em: (http://www.biodieselbrasil.com.br). Acesso em: 27 julho, 2007.

RHAMAN, K. S. M., BANAT, I. M., THAHIRA, J., THAYUMANAVAN, T.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended whit poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. Bioresource Technology, n. 81 p. 25-32, 2002.

RAMANA, K.V. KARANTH, N.G. Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. Journal of Technology and Biotechnology, n 45, p 249-257, 1989a.

RAMANA, K.V. KARANTH, N.G. Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. Journal of Technology and Biotechnology, n 45, p 249-257, 1989 b.

REIS, F. A. S. L., SERVULO, E. F. C., FRANÇA, F. P. Lipopeptide surfactant production by Bacillus subtilis grown on low-cost raw materials. *Applied Biochemistry and Biotechnology,* 115, 899-912, 2004.

REISER, J. K. A. K., KOCH, K., KAPPELI. O. Structure, properties, and production of biosurfactant, p. 85-97. In J. W. OBRINGER and H. S. TILLINGHAST (ed), Advances in biotechology for aerospace applications. The Portfolio Publishing Co., The Woodlands Tex., 1989.

REISER, J. K. A. K., OCHSNER, U. A., FIECHER, A. Genetic of surface-active compounds. Biosurfactants (surfactant Science series) in: Dekker, (ed.) Nova York. v. 48, p. 231-249, 1993.

RENDELL, N. B., TAYLOR, G. W., SOMERVILLE, M., TODD, H, WILSON, R., COLE J., Characterization of *Pseudomonas* rhamnolipids. Biochem. Biophys., p.189-1993, 1990.

RIO DE JANEIRO (Estado). Aulas de Pós-Graduação. Alternativas tecnológicas sustentáveis no processamento de óleos vegetais –EQE706. Oleaginosas de interesse comercial e seus usos. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em (www.eq.ufrj.br/posgraduacao/aulas/suely/2006/aula2_oleaginosas.ppt). Acesso em: 24 fev. 2006.

RISTAU, E., WAGNER, F. F. Formation of novel anionic trealose tetraesters from *Rhodococcus erythopolis* growth-limiting conditions. Biotechnology Letters, n. 5, p. 95-100, 1983.

ROBERT, M.; MERCADÉ, M.E.; BOSH, M.P.; PARRA, J.L.; ESPUNY, M.J.; MANRESA, M.A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. Biotechnology Letters, v.1, n. 2, 871-874, 1989.

ROBERT, M. MERCADÉ,E.; ANDRÉS, C.; ESPUNY, M.J.; MANRESA, M.A.; GUINEA, J. Optimización de la producción de biotensoactivos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. Grasas y Aceites, v.42, n.1, p.1-7, 1991.

ROCHA C. SAN-BLAS, F. SAN-BLAS, G. VIERNA, L. Biosurfactant production by two isolates *Pseudomonas aeruginosa*. World Journal of Microbiology and Biotecnology, v. 8, p 125-128, 1992.

RON, E. Z., ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. In: Current Opinion in Biotechnology. Editora Elsevier, v.13, p.249–252, 2002.

ROSEN, M. J. Surfactants and interfacial phenomena. Ed John Wilwy & Sons, USA, 431 p, 1989.

ROSENBERG, E., RUBINOVITZ, C., GOTTLIEB, A., ROSENHAK, S., RON, E. Z. Production of biodispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2, 1988.

ROSENBERG, E. & RON E. Z. High and low molecular mass microbial surfactants. Applied Microbiology and Biotechnology, 52, 154 - 162, 1999.

RUFINO, D. R. SARUBBO, L. A., TAKAKI, M. G. Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* utilizando substrato de baixo custo. SINAFERM XV SimposioNacional de Bioprocessos - Recife, 2005.

SANIBAL, E. A., MANCINI-FILHO, J., Food Ingred. *South Am.*, p. 18-64, 2002.

SANTA ANNA, L. M. SEBASTIAN, G. V. FREIRE D. M. G. MENESES, E. P., ALVES, T. L. M. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosas* PA 1. Applied Biochem. And Biotechnol. p. 90-93, 2001.

SANTA-ANNA, L. M. SEBASTIAN, G. V., PEREIRA J. N., SANTOS A. S., MENEZES E. and FREIRE D. M. G. Production of biosurfactant from Pseudomonas aeruginosa PA1 isolated in oil environmental. Braz. Journal Chem. Eng. v. 19, p. 159-166, 2002.

SANTOS, A. S., SAMPAIO, A. P., VASQUEZ, G. S., SANTA ANNA, L. M., FREIRE, D. M. G., Evaluation of different carbon in nitrogen sources in production of rhamnolipis by a strain *Pseudomonas aeruginosa*. Applied Bioch. and Biotechnol. p. 98-100, 2002.

SARUBBO, L. A., PORTO, A. L. F., CAMPOS TAKAKI, C. M. The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. Canadian Journal of Microbiology, n 45, p 423-426, 1999.

SGARBIERI, V.C., ALVIM, I.D., VILELA, E.S.D., BALDINI, V.L.S., BRAGAGNOLO, N. Produção Piloto de Derivados de Levedura (*Saccharomyces* sp.) para Uso como Ingrediente na Formulação de Alimentos. Brazilian Journal of Food Technolology, v. 2, p. 119-125, 1999.

SHEPHERD, R., ROCKEY, J., SHUTHERLAND, J. W., ROLLER, S. Bioemulsifier from microrganisms for use in foods. Journal of Biotechnology, n. 40, p. 316-320, 1995.

SHETTY, J. K., KINSELLA, J. E. Isolation of yeast protein with reduced nucleic acid level using reversible acylating reagents: some properties of the isolated proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v, 30, n. 6, p. 166-1171, 1982.

SIDDHARTHA, G. V. A. O., COSTA, M. N., HADDAD, R., EBERLIN, M. N., CONTIERO, C. Production of Pseudomonas aeruginosa LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. Process Biochemistry, v. 41, p. 483–488, 2006.

SIM, L., WARD, O.P., LI, Z.Y. Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. Journal of Industrial Microbiology an Biotechnology, v. 19, p.232-238, 1997.

SINGER, M. E. V., FINNERTY, W. R. Physiology of biosurfactant synthesis by *Rhodoccus species* H13-ª Canadian Journal of Microbiology, v.36, p. 741-745, 1990.

STANDARD methods for the Examination of Water and Wastewater 20th (Ed.) 4, 125-150, 1998.

STUWER, O., HOMMEL, R., HAFERBURG, D., KIEBER, H. P. Production of crystalline surface-active glycolipids by a strain of *Torulopsis apicola*. Journal of Biotechnology, n. 6, p. 259-269, 1987.

SYLDATK, C., LANG, S., WAGNER, F. Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* sp. DSM 2874 grown on n-alkanes. Zeitschrift für Naturforsch, n. 46c, p. 51-60, 1985.

SYLDATK, C.; WAGNER, F. Production of Biosurfactants. *In: Biosurfactants and Biotecnology*, ed. N. Kosaric, W.L. Cairns & N.C.C. Gray. Marcel Dekker, New York, NY, pp 89-120, 1987.

TADROS, T.F. Surfactants, industrial applications. Encyclopedia of physical science and technology, Academic Press Inc. Orlando, v. 10, p. 462-464, 1987.

TULLOCH, A. P., SPENCER, J. F. T. The fermentation of log-chain compounds by *Torulopsis magnoliae*. Canadian Journal of Microbiology, v. 40, 1962.

TURKOVSKAYA, O. V., DMITRIEVA, T. V., MUROTOVA, A. A biosurfactant production *Pseudomonas aeruginosa* strain. Applied Biochimemistry and Microbiology. Vol. 37, n. 1, p.71-75, 2001.

ULLRICH, C., KLUGE, B., PALACZ, Z., VATER, J. Cell-free biosynthesis of surfactin, a ciclic lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*. Biochemistry, v.30, n.26, p.6503-6508, 1991.

URUM, K. PEKDEMIR, T. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. Chemosphere, v. 57 p. 1139–1150, 2004.

VANANUVAT, P. Value of yeast protein for poultry feed, CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 9, n. 4, p. 325-343, 1977.

VAN DYKE, M. I., COUTURE, P., BRAUER, M., LEE, H., TREVORS, J. T. *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. Canadian Journal of Microbiology, v.39, p.1071-1078, 1993.

VECCHIOLI, G. I., DEL PANNO, M. T., PAINCEIRA, M. T Use of Selected Autochthonous Soil Bacteria to Enhance Degradation of Hydrocarbons in Soil Environmental Pollution, v. 67, n. 3, p. 249-258, 1990.

VOLLBRECHT, E., HECKMANN, R., WRAY, V., NIMTZ, M., LANG, S. Production and structure elucidation of di- and oligosaccharide lipids (biosurfactant) from *Tsukamurella* sp. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 50, p. 530-537, 1998.

WALSIEN, C.I., CALLOWAY, D.H., MARGEN, S., COSTA, F. Uric acid levels in men fed algae and yeast as protein sources. Journal of Food Science, v. 35, n. 2, p. 293-298, 1970.

WALSIEN, C.I. Unusual source of protein for man, CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 6, n. 1, p. 77-151, 1975.

WONGSA, P., TANAKA, M., UENO, A., HASANUZZAMAN, M., YUMOTO, I., OKUYAMA, H. Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil, v. 49, n. 6, p. 415-22, 2004.

WU, J., JU, L. K. Extracelular particle of polimeric material formed in n-hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Biotechnology, v.59, p.193-202, 1998.

YAMAGUCHI, T., ISHIDA, M., SUZUKI, T. Biodegradation of hydrocarbons by Protheca zopfii in rotation biological contactors. Process Biochemistry, v. 35, p. 403-409, 1999.

YU-HONG, W., CHIEN-LIANG, C., JO-SHU, C. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. Biochemical Engineering Journal, v. 27, p. 146–154, 2005.

ZAJIC, J.E., SEFFENS, W. In: CRC Critical Reviews in Biotechnology, Biosurfactants, v.1, n.2, 1984.

ZHANG, Y, MILLER, R. M. Enhanced octadecane suspension and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). Applied and Environmental Microbiology, v.58, n.10, p. 3276-3282, 1992.

ZHOU, Q. H. KOSARIC, N. Utilization of canola oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombiocola* Journal of American Oil Chemists Society, v. 72, n 1, p. 67-72, 1995.

ZUCKERBERG, A., DIVER, A., PEERI, Z., GUTNICK, D. L., ROSENBERG, E. Emulsifier of Arthrobacter RAG-1: Chemical and Physical Properties. Appl Environ Microbiol. v.37, n. 3, p. 414-420, 1979.