



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



**APROVEITAMENTO DE EFLUENTE GORDUROSO GERADO POR
ABATEDOURO E FRIGORÍFICO PARA PRODUÇÃO DE
BIOSURFACTANTE**

Wesley da Silva Borges

UBERLÂNDIA - MG
2011



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



**APROVEITAMENTO DE EFLUENTE GORDUROSO GERADO POR
ABATEDOURO E FRIGORÍFICO PARA PRODUÇÃO DE
BIOSSURFACTANTE**

Wesley da Silva Borges

Orientadoras:

Dra. Miriam Maria de Resende

Dra. Vicelma Luiz Cardoso

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

UBERLÂNDIA - MG
2011

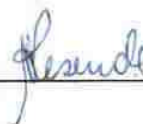
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG - Brasil

- B732a Borges, Wesley da Silva, 1985-
 Aproveitamento de efluente gorduroso gerado por abatedouro e
 frigorífico para produção de biossurfactante [manuscrito] / Wesley da
 Silva Borges. - 2011.
 106 f. : il.
- Orientadoras: Miriam Maria de Resende e Vicelma Luiz Cardoso.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
 grama de Pós-Graduação em Engenharia Química.
 Inclui bibliografia.
1. Agentes ativos de superfícies. 2. Controle de processos químicos -
 Teses. I. Resende, Miriam Maria de. II. Cardoso, Vicelma Luiz. III.
 Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
 Engenharia Química. III. Título.

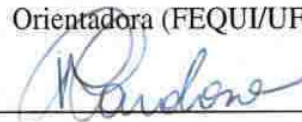
CDU: 661.185

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE WESLEY DA SILVA BORGES SUBMETIDA
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA
QUÍMICA, EM 09/02/2011.

BANCA EXAMINADORA:



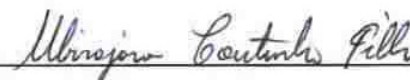
Prof.ª Dr.ª Miriam Maria de Resende
Orientadora (FEQUI/UFU)



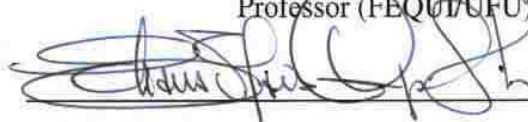
Prof.ª Dr.ª Vicelma Luiz Cardoso
Orientadora (FEQUI/UFU)



Prof.ª Dr.ª Patrícia Angélica Vieira
Professora (FEQUI/UFU)



Prof.º Dr. Ubirajara Coutinho Filho
Professor (FEQUI/UFU)



Prof.ª Dr.ª Eliana Flávia Camporese Sérvulo
Professora (EQ/UFRJ)

A todos os familiares e colegas que contribuíram para a conclusão deste Curso.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos familiares.

As orientadoras Prof^ª. Dr^ª. Miriam Maria de Resende e Prof^ª. Dr^ª. Vicelma Luiz Cardoso por toda a orientação e dedicação.

Aos colegas de Curso.

Aos alunos de iniciação científica Ocinéria, Michel e Suellen, que tanto ajudaram na realização dos experimentos.

Aos funcionários da FEQUI.

Ao Programa de Pós-Graduação FEQUI.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização deste trabalho.

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

(Fernando Pessoa)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE SÍMBOLOS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS.....	3
2.1 - Geral.....	3
2.2 - Específicos.....	3
CAPÍTULO 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 - A indústria frigorífica.....	4
3.1.1 Flotado industrial.....	5
3.2 - Surfactantes e biossurfactantes.....	8
3.2.1 - Tipos de Biossurfactantes.....	10
3.2.1.1 - Glicolipídeos.....	11
3.2.1.2 - Lipopeptídeos e lipoproteínas.....	14
3.2.1.3 - Ácidos graxos e fosfolipídeos.....	16
3.2.1.4 - Poliméricos.....	16
3.2.1.5 - Particulados.....	17
3.2.2 - Propriedades gerais e funções dos biossurfactantes.....	18
3.2.3 - Produção de biossurfactantes.....	19
3.2.4 - Aplicações.....	24
3.3 - Resíduo de leveduras.....	25
3.4 - Emulsões.....	28
3.5 - Planejamento de experimentos.....	29
CAPÍTULO 4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 - Micro-organismo.....	30
4.2 - Fonte de carbono.....	30
4.3 - Caracterização da matéria-prima: efluente gorduroso.....	30
4.3.1 - Concentração de Nitrogênio Kjeldhal total.....	31
4.3.2 - Determinação do teor percentual de gordura.....	31
4.4 - Meios de cultura.....	31
4.4.1 - Meio de cultura para a manutenção das linhagens.....	31
4.4.2 - Meio de cultura para o preparo do inóculo.....	32
4.4.3 - Meio de cultura utilizado no processo fermentativo para a produção do biossurfactante.....	32
4.5 - Avaliação da produção do biossurfactante.....	34

4.6 - Experimentos	34
4.6.1 - <u>Preparo do inóculo</u>	34
4.6.2 - <u>Avaliação das variáveis concentração de efluente gorduroso, nitrato de amônio e concentração de levedura cervejeira autolisada residual aplicando um planejamento experimental fatorial</u>	34
4.6.3 - <u>Estudo cinético entre as linhagens ATCC 9027 e ATCC 10145</u>	35
4.6.4 - <u>Planejamento composto central (PCC) para as variáveis concentração de efluente gorduroso, nitrato de amônio e concentração de levedura cervejeira autolisada residual</u>	36
4.6.5 - <u>Estudo cinético para avaliar melhor tempo de fermentação no reator</u>	39
4.7 - Procedimentos analíticos	40
4.7.1 - <u>Acompanhamento da fermentação</u>	40
4.7.2 - <u>Tensão superficial</u>	40
4.7.3 - <u>Concentração de raminose</u>	41
4.7.4 - <u>Índice de emulsificação</u>	41
4.7.5 - <u>Biomassa (massa seca)</u>	42
 CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 – Acompanhamento da fermentação	44
5.2 - Caracterização do efluente gorduroso	44
5.2.1 - <u>Quantidade de Nitrogênio Kjeldhal</u>	44
5.2.2 - <u>Quantidade de gordura presente na amostra</u>	44
5.3 - Planejamento fatorial a 2 níveis para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 e ATCC 10145	44
5.4 - Análise Cinética para as linhagens ATCC 9027 e ATCC 10145	56
5.5 - Planejamento Composto Central (PCC) para as variáveis concentração de efluente, nitrato de amônio e concentração de levedura cervejeira autolisada residual	58
5.5.1 - <u>Análise do PCC para a resposta concentração de raminose</u>	59
5.5.2 - <u>Análise do PCC para a resposta tensão superficial</u>	66
5.5.3 - <u>Análise do PCC para a resposta emulsificação</u>	72
5.5.4 - <u>Análise do PCC para a resposta concentração final de células</u>	78
5.5.5 - <u>Comparação entre as faixas ótimas para a concentração de raminose, tensão superficial, índice de emulsificação e concentração final de células</u>	83
5.6 - Reprodutibilidade do processo fermentativo com melhores condições experimentais do PCC	85
5.7 - Cinética para avaliar melhor tempo de fermentação no reator, empregando condições otimizadas das variáveis concentração de efluente, nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada residual	86
 CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES	89
6.1 - Conclusões	89
6.2 - Sugestões para trabalhos futuros	90
 CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

CAPÍTULO 8 - ANEXOS.....	101
CAPÍTULO 9 - APÊNDICES.....	104

LISTA DE FIGURAS

Fig. 3.1 - Fluxograma indústria frigorífica.....	6
Fig. 3.2 - Estruturas dos biossurfactantes.....	9
Fig. 3.3 - Estrutura do raminolípídeo tipo I produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
Fig. 3.4 - Estrutura do raminolípídeo tipo II produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
Fig. 3.5 - Estrutura do soforolípídeo produzido por <i>Torulopsis bombicola</i>	13
Fig. 3.6 - Estrutura do trealolípídeo produzido por <i>Rhodococcus erythropolis</i>	15
Fig. 3.7 - Estrutura do lipopeptídeo surfactina produzido por <i>Bacillus subtilis</i>	15
Fig. 3.8 - Estrutura do fosfolípídeo.....	16
Fig. 3.9 - Estrutura do surfactante polimérico Emulsan produzido por <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	17
Fig. 3.10 - Forças intermoleculares no interior e na superfície de um líquido	19
Fig. 3.11 - Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> íntegra e autolisada.....	27
Fig. 4.1 - Amostra do efluente gorduroso.....	31
Fig. 4.2 - Reator <i>B. Braun Biotech International</i>	33
Fig. 4.3 - Tensiômetro utilizado nas análises de tensão superficial.....	40
Fig. 4.4 - Amostras para curva de calibração da raminose.....	41
Fig. 4.5 - Agitador de tubos Vortex em análise do índice de emulsificação.....	42
Fig. 5.1 - Diagrama de Pareto com variáveis estudadas e suas interações para resposta concentração de raminose.....	46
Fig. 5.2 - Distribuição dos resíduos relativo à concentração de raminose.....	48
Fig. 5.3 - Valores preditos em função dos observados relativos à concentração de raminose.....	48
Fig. 5.4 - Diagrama de Pareto com variáveis estudadas e suas interações para tensão superficial.....	49

Fig. 5.5 - Distribuição dos resíduos relativo à tensão superficial.....	50
Fig. 5.6 - Valores preditos em função dos observados relativos à tensão superficial.....	51
Fig. 5.7 - Diagrama de Pareto com variáveis estudadas para o índice de emulsificação.....	51
Fig. 5.8 - Distribuição dos resíduos relativo ao índice de emulsificação.....	52
Fig. 5.9 - Valores preditos em função dos observados relativos ao índice de emulsificação...	53
Fig. 5.10 - Diagrama de Pareto com variáveis estudadas para resposta concentração final de células.....	53
Fig. 5.11 - Distribuição dos resíduos relativo à concentração final de células.....	55
Fig. 5.12 - Valores preditos em função dos observados relativos à concentração final de células.....	55
Fig. 5.13 - Evolução ao longo do tempo para concentrações raminose (RM), tensão superficial (TS), índice de emulsificação (IE) e concentração final de células (X_f) em fermentação por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 e ATCC 10145 em reator batelada com taxa de aeração 0,5 vvm, velocidade de agitação de 550 rpm, temperatura de $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e volume útil de 1,5 L. Meio de cultura composto por: 50 g/L de efluente gorduroso; 1g/L de NH_4NO_3 ; 15 g/L de levedura cervejeira autolisada residual; 0,2g g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 7,0 g/L de Na_2HPO_4 ; 3,0 g/L de KH_2PO_4	57
Fig. 5.14 - Diagrama de Pareto com variáveis estudadas e suas interações para resposta concentração de raminose.....	60
Fig. 5.15 - Distribuição dos resíduos em função dos valores preditos relativo à concentração de raminose.....	61
Fig. 5.16 - Valores preditos em função dos observados para a concentração de raminose.....	62
Fig. 5.17 - Superfície de resposta para síntese de raminose em relação à concentração de efluente e nitrato de amônio.	63
Fig. 5.18 - Curvas de contorno para síntese de raminose em relação à concentração de efluente e nitrato de amônio.....	63
Fig. 5.19 - Superfície de resposta para síntese de raminose em relação à concentração de efluente e levedura cervejeira autolisada residual.....	64
Fig. 5.20 - Curvas de contorno para síntese de raminose em relação à concentração de efluente e levedura cervejeira autolisada residual.....	64
Fig. 5.21 - Superfície de resposta para síntese de raminose em relação à concentração de nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada residual.....	65

Fig. 5.22 - Curvas de contorno para síntese de raminose em relação à concentração de nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada residual.....	65
Fig. 5.23 - Diagrama de Pareto com variáveis estudadas e suas interações para tensão superficial.....	66
Fig. 5.24 - Distribuição dos resíduos relativo à tensão superficial.....	67
Fig. 5.25 - Valores preditos em função dos observados relativos à tensão superficial.....	68
Fig. 5.26 - Superfície de resposta para tensão superficial em relação à concentração de efluente e nitrato de amônio.....	69
Fig. 5.27 - Curvas de contorno para tensão superficial em relação à concentração de efluente e nitrato de amônio.....	70
Fig. 5.28 - Superfície de resposta para tensão superficial em relação à concentração de efluente e levedura cervejeira autolisada residual.....	70
Fig. 5.29 - Curvas de contorno para tensão superficial em relação à concentração de efluente e levedura cervejeira autolisada residual.....	71
Fig. 5.30 - Superfície de resposta para tensão superficial em relação à concentração de nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada residual.....	71
Fig. 5.31 - Curvas de contorno para tensão superficial em relação à concentração de nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada residual.....	72
Fig. 5.32 - Diagrama de Pareto com variáveis estudadas para o índice de emulsificação.....	72
Fig. 5.33 - Distribuição dos resíduos relativo ao índice de emulsificação.....	74
Fig. 5.34 - Valores preditos em função dos observados relativos ao índice de emulsificação.....	74
Fig. 5.35 - Superfície de resposta para emulsificação em relação à concentração de efluente e nitrato de amônio.....	75
Fig. 5.36 - Curvas de contorno para emulsificação em relação à concentração de efluente e nitrato de amônio.....	75
Fig. 5.37 - Superfície de resposta para emulsificação em relação à concentração de efluente e levedura cervejeira autolisada residual.....	76
Fig. 5.38 - Curvas de contorno para emulsificação em relação à concentração de efluente e levedura cervejeira autolisada residual.....	76
Fig. 5.39 - Superfície de resposta para emulsificação em relação à concentração de nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada residual.....	77

Fig. 5.40 - Curvas de contorno para emulsificação em relação à concentração de nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada residual.....	77
Fig. 5.41 - Diagrama de Pareto com variáveis estudadas para resposta concentração final de células.....	78
Fig. 5.42 - Distribuição dos resíduos relativo à concentração final de células.....	79
Fig. 5.43 - Valores preditos em função dos observados relativos à concentração final de células.....	79
Fig. 5.44 - Superfície de resposta para concentração final de células em relação à concentração de efluente e nitrato de amônio.....	80
Fig. 5.45 - Curvas de contorno para concentração final de células em relação à concentração de efluente e nitrato de amônio.....	80
Fig. 5.46 - Superfície de resposta para concentração final de células em relação à concentração de efluente e levedura cervejeira autolisada residual.....	81
Fig. 5.47 - Curvas de contorno para concentração final de células em relação à concentração de efluente e levedura cervejeira autolisada residual.....	81
Fig. 5.48 - Superfície de resposta para concentração final de células em relação à concentração de nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada residual.....	82
Fig. 5.49 - Curvas de contorno para concentração final de células em relação à concentração de nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada residual.....	82
Fig. 5.50 - Evolução ao longo do tempo das concentrações raminose (■), tensão superficial (▲), índice de emulsificação (●) e massa seca (★) em relação ao tempo de fermentação. A taxa de aeração no reator foi de 0,5 vvm, agitação de 550 rpm, temperatura de $30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e volume útil de 1,5 L. Meio de cultura composto por: 50 g/L de efluente gorduroso; 15 g/L de levedura cervejeira autolisada residual; 0,2g g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 7,0 g/L de Na_2HPO_4 ; 3,0 g/L de KH_2PO_4 , sem adição de NH_4NO_3	87
Fig. 9.1 - Curva de calibração para a concentração de raminose.....	106

LISTA DE TABELAS

Tab. 3.1 - Composição do Flotado Industrial.....	7
Tab. 3.2 - Cargas e concentrações de poluentes da indústria frigorífica	8
Tab. 3.3 - Aplicações dos biossurfactantes.....	9
Tab. 3.4- Tipos de biossurfactante e micro-organismos produtores.....	10
Tab. 3.5 - Tipos de emulsões em alimentos	28
Tab. 4.1 - Composição do meio de cultura para manutenção das linhagens.....	31
Tab. 4.2 - Composição do meio de cultura para crescimento do micro-organismo.....	32
Tab. 4.3 - Composição do meio de cultura para a produção do biossurfactante.....	33
Tab. 4.4 - Matriz do planejamento experimental fatorial 2 ⁴	36
Tab. 4.5 - Matriz do planejamento composto central.....	37
Tab. 4.6 - Matriz do planejamento composto central com valores reais para concentração de efluente, nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada.....	38
Tab. 5.1 - Matriz do planejamento experimental fatorial 2 ⁴	45
Tab. 5.2 - Resultados do planejamento composto central em relação à concentração de efluente, concentração de nitrato de amônio e concentração de levedura cervejeira autolisada residual.....	59
Tab. 5.3 - Resultados das melhores concentrações de efluente, nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada residual	84
Tab. 5.4 - Comparativo entre os resultados dos pontos centrais do PCC e reprodução do melhor ponto na condição otimizada	86
Tab. 9.1 - Leitura do espectrofotômetro em relação a solução padrão de raminose para construção da curva de calibração.....	105

LISTA DE SÍMBOLOS

$\geq$ - Maior ou igual

a, b, c,...p - Parâmetros da equação

A/O - Emulsão água em óleo

ABS. - Valor da leitura em absorbância

Agit. - Velocidade da agitação em rotações por minuto

CMC - Concentração micelar crítica

DQO - Demanda bioquímica de oxigênio

FDA - Food and Drug Administration

G - Número de pontos fatoriais

IE - Índice de emulsificação em porcentagem

Inóc. - Concentração inicial de inóculo em g/L

K - Número de variáveis estudadas no planejamento experimental

LCA - Concentração de levedura cervejeira autolisada residual em g/L

NA - Concentração de nitrato de amônio em g/L

O/A - Emulsão óleo em água

PCC - Planejamento composto central

PF - Planejamento fatorial

R^2 - Coeficiente de determinação

RM - Concentração de raminose em g/L

RMP - Concentração de raminose padrão em g/L

rpm - rotações por minuto

T - Número de pontos adicionais do planejamento composto central

t - t de Student

TS - Tensão superficial em dina/cm

vvm - volume de ar por minuto pelo volume do líquido

X_{+1} - Valor da variável no nível superior

X_0 - Valor da variável no ponto central

X_{-1} - Valor da variável no nível inferior

X_f - Concentração final de células em g/L

X_n = valor codificado da variável ($n = 1, 2, \dots$)

α - Alfa de ortogonalidade

β_0 - Valor médio da resposta

ΔX - Diferença entre a concentração inicial e final da biomassa em g/L

λ - Valor das raízes características

RESUMO

Os surfactantes produzidos por micro-organismos apresentam as mesmas características dos surfactantes sintéticos, sendo capazes de reduzir a tensão superficial em soluções aquosas e em misturas de hidrocarbonetos. Neste trabalho estudou-se a produção de biossurfactante por fermentação de gorduras provenientes de flotações de estação de tratamento de efluentes de abatedouros de aves e suínos, contendo 19,48 g/L de gordura e 0,2 g/L de nitrogênio. Avaliou-se a produção de raminolipídeo empregando duas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027 e 10145) em relação às variáveis de processo: concentração de efluente gorduroso, concentração de nitrogênio, pela adição de nitrato de amônio, e concentração de levedura cervejeira autolisada residual, aplicando um planejamento fatorial (PF) e um planejamento composto central (PCC). Os experimentos ocorreram em um reator batelada, modelo *B. Braun International* com volume útil de 1,5 L para fermentações em 48 horas com nível de aeração de 0,5 vvm, velocidade de agitação de 550 rpm e concentração inicial do micro-organismo de $1,0 \pm 0,2$ g/L de células. Os resultados do PF mostraram que a linhagem *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 apresentou-se como a mais eficiente para produzir biossurfactante em relação à ATCC 9027, pois nas mesmas condições das variáveis de processo, a linhagem ATCC 10145 conseguiu produzir 0,94 g/L a mais de raminose e reduzir em 0,8 dina/cm a tensão superficial do meio em relação ao resultado obtido pela ATCC 9027. Além disso, a linhagem ATCC 10145 apresentou índice de emulsificação de 100% e crescimento celular 1,17 g/L a mais que ATCC 9027, apresentando uma produção do raminolipídeo parcialmente associada ao crescimento celular, com o melhor tempo de fermentação de 48 horas. Com a linhagem escolhida pelo PF, fez-se uma otimização dos resultados em um PCC. As variáveis utilizadas no PCC foram: concentração de efluente, concentração de nitrato de amônio e concentração de levedura cervejeira autolisada residual. Na otimização dos resultados, a melhor concentração de efluente para a produção do biossurfactante com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 foi de 60 g/L, com concentração de levedura cervejeira autolisada residual de 15 g/L, sem a adição de nitrato de amônio como fonte de nitrogênio, alcançando 3,84 g/L de raminose e 100% de índice de emulsificação.

Palavras-chave: Biossurfactante, efluente gorduroso, raminose.

ABSTRACT

Surfactants produced by microorganisms have the same characteristics of synthetic surfactants, both are able to reduce surface tension in aqueous solutions and at hydrocarbon mixtures. In this work biosurfactant production was studied by fermentation of fats from slaughterhouse floaters in a treatment plant effluents, what contains 19.48% of fat and 0.2 g/L of nitrogen used to Rhamnolipid using two *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027 and ATCC 10145) in relation to the process variables: concentrations of fatty effluent, nitrogen by ammonium nitrate addition, brewery residual yeast, using a complete factorial experimental design and central composite design (CDD). The experiments were carried out in the bioreactor model *B. Braun International* with working volume of 1.5 L for 48 hours with aeration level of 0.5 vvm, agitation speed of 550 rpm and initial concentration of microorganism was 1.0 ± 0.2 g/L cells. The results of factorial experimental design showed that the *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 was more efficient than ATCC 9027, because for the same conditions of process variables, the strain ATCC 10145 was able to produce 0.94 g/L rhamnolipid more than ATCC 9027, and was capable to reduce the superficial tension to 0.8 dyne/cm in relation to the result obtained by ATCC 9027. Furthermore, strain ATCC 10145 showed emulsifying activity of 100% and cell growth of 1.17 g/L more than ATCC 9027, with production of rhamnolipid partially associated to cell growth, and the best fermentation time of 48 hours. From the strain chosen in the factorial experimental design, the optimization of results was carried out in a CCD. The variables used in the CCD were: concentrations of fatty effluent, ammonium nitrate, and brewery residual yeast. In the optimization of the results, the best concentration of fatty effluent for the biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 was 60 g/L, with concentration of brewery residual yeast 15 g/L, without the addition of ammonium nitrate as a source of nitrogen, producing 3.84 g/L rhamnolipid and 100% for emulsifying activity.

Keywords: Biosurfactant, fatty effluent, rhamnolipid.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A maioria dos surfactantes disponíveis no mercado é produzida a partir do petróleo. Porém, a crescente preocupação com o meio ambiente tem estimulado pesquisas para a produção de surfactantes naturais, segundo Nitschke e Pastore (2002), que são metabólitos microbianos e possuem moléculas com porções hidrofílicas e hidrofóbicas que se distribuem nas interfaces entre fases fluídas com diferentes graus de polaridade, o que proporciona o fator de redução da tensão superficial e interfacial de substâncias aquosas. A parte hidrofílica é composta por grupos aniônicos, catiônicos, não-aniônicos ou anfóteros. Já o lado hidrofóbico, ainda é em sua maior parte composto por um hidrocarboneto (ARAÚJO *et al.*, 2003).

Os surfactantes podem possuir ação emulsificante, solubilizante e formação de micelas (concentração micelar crítica – CMC, que é um dos índices mais utilizados para avaliação da atividade surfactante). Essa concentração de micelas corresponde a concentração mínima de surfactante necessária para atingir a menor tensão superficial ou interfacial de uma fase aquosa (ARAÚJO *et al.*, 2003). Segundo Barbosa e Paz (2007), os surfactantes produzidos por micro-organismos e os surfactantes químicos possuem estruturas semelhantes com a parte hidrofílica composta de aminoácidos ou peptídeos e a parte hidrofóbica formada por uma cadeia hidrocarbônica.

Para os biossurfactantes a classificação se dá pela sua composição e pelo micro-organismo utilizado em sua produção (BANAT, 2000). Segundo Tuleva *et al.* (2002), os raminolipídeos são biossurfactantes que pertencem à classe glicolipídeos sendo produzidos principalmente pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias Gram-negativas a partir de hidrocarbonetos. Os raminolipídeos se mostram eficientes na biorremediação de solos poluídos por compostos oleosos (SANTA ANNA *et al.*, 2007). Para Pirôllo (2006), os raminolipídeos constituem de uma ou duas moléculas de raminose ligadas a uma ou duas cadeias de ácido graxo, com 8-12 átomos de carbono, que podem ser saturados ou insaturados.

A utilização de biossurfactantes possui a grande vantagem de que podem ser modificados por técnicas genéticas e/ou bioquímicas conforme a necessidade de seu uso e assim atendem a normas específicas relacionadas à biodegradabilidade, o que é contrário aos

surfactantes, que por não serem biodegradáveis geram problemas ambientais devido sua toxicidade e acúmulo em ecossistemas naturais (KRONEMBERGER, 2007).

Para Kronemberger (2007) os biossurfactantes também são usados para facilitar o transporte de petróleo em tubulações, pois reduz a viscosidade, reduzindo assim custos no transporte.

Nitschke e Pastore (2002) relatam que a grande aplicação dos biossurfactantes se dá com as suas propriedades de emulsão, separação, solubilização, redução da tensão superficial e viscosidade, e essas características fornecem uma vasta gama de uso por indústrias de alimentos, agrícolas, têxteis e farmacêuticas. Para Barbosa e Paz (2007) e para Gallert e Winter (2002), os biossurfactantes possuem a detergência como característica principal, o que torna este um produto versátil para a reduzir poluições ambientais.

Os biossurfactantes são utilizados em processos de biorremediação para degradarem substratos insolúveis em água, gorduras e óleos, conforme Mulligan (2004) e Pattanathu *et al.* (2008). Esses fatores estimularam a idéia de produção de biossurfactante, a partir dos resíduos gerados em abatedouros visando a sua utilização na própria estação de tratamento de efluente dessa indústria.

A produção comercial de biossurfactantes com a finalidade de substituição de surfactantes químicos é um objetivo a ser alcançado em longo prazo (COLLA, 2003). Para Desai e Banat (1997) o custo para se produzir um biossurfactante é cerca de 3 a 10 vezes acima o custo de um surfactante químico, isso devido à utilização, em sua maioria das vezes, de substratos caros, o que faz com que sejam pesquisados substratos alternativos, como o etanol, glicerol e efluentes industriais. Segundo Wu *et al.* (2007) é necessário o desenvolvimento de um biossurfactante com uma boa relação custo eficácia.

A utilização de efluentes industriais, como resíduos agrícolas e/ou resíduos gordurosos como substrato é uma alternativa de baixo custo para a produção de biossurfactantes (BARBOSA e PAZ, 2007). Os resíduos gordurosos provenientes da indústria frigorífica, com alta carga orgânica, gorduras, nitrogênio e fósforo, segundo Pacheco (2006b) podem ser esta alternativa como substrato. Neste contexto, este trabalho se propõe a estudar a produção de biossurfactante por fermentação de um efluente com alto teor de gordura proveniente dos flotores de abatedouros de aves e suínos.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1 - Geral

Este trabalho possui como objetivo geral estudar a produção de biossurfactante por fermentação de gorduras provenientes de flotadores da estação de tratamento de efluentes de abatedouros de aves e suínos.

2.2 - Específicos

- Selecionar uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* entre dois tipos (ATCC 9027 e 10145) que seja capaz de produzir um biossurfactante a partir de resíduo de flotadores de abatedouros de aves e suínos;
- Otimizar a produção de raminolipídeos em relação às variáveis: concentração de efluente, concentração de nitrato de amônio e de levedura cervejeira autolisada residual;
- Avaliar a reprodutibilidade dos resultados obtidos na otimização;
- Determinar por meio de estudo cinético o tempo ótimo de fermentação;
- Comparar a produção do biossurfactante com valores obtidos pela literatura para verificação da viabilidade de sua produção;

CAPÍTULO 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - A indústria frigorífica

O abate de aves e suínos no Brasil possui uma produção em torno de 12 milhões de toneladas de carne por ano, sendo aproximadamente 9 milhões de carne de frango e 3 milhões de carne suína, segundo a última pesquisa realizada no setor em 2009 (COLDEBELLA e SCHEUERMANN, 2009).

A obtenção de carnes e derivados geram alguns subprodutos e resíduos que devem sofrer processamentos específicos, como gorduras, ossos e aparas de carne. Em geral, o objetivo final do processamento ou destinação destes resíduos é feito conforme a legislação da região em que o frigorífico está instalado. Por exemplo, o sangue pode ser vendido para indústria de fertilizantes e para processamento com o intuito de comercialização de seus componentes, como a albumina e o plasma ou até mesmo enviado para graxarias para a produção de farinha de sangue, útil no preparo de rações animais (PACHECO, 2006a).

Em geral, a indústria frigorífica pode ser dividida em: abatedouros, frigoríficos e graxarias. Os abatedouros são os locais onde ocorre o abate de animais; o frigorífico é o setor em que ocorre o processamento da carne e geração de derivados, embora alguns frigoríficos também possam exercer a função dos abatedouros; e na graxaria ocorre o processamento de subprodutos ou resíduos, tanto dos abatedouros como dos frigoríficos, como sangue, ossos e gorduras. Na graxaria os produtos principais são a gordura animal para a indústria química e a farinha de carne e de ossos para rações de animais (PACHECO, 2006a).

Em geral, os efluentes da indústria frigorífica são caracterizados por conterem uma alta carga orgânica, altos teores de gordura, e de nitrogênio, fósforo e sal (VILAS BOAS *et al.*, 2001). Coldebella e Scheuermann (2009) classificam os resíduos frigoríficos em: subprodutos não comestíveis e efluentes líquidos.

Os subprodutos não comestíveis são formados por vísceras, órgãos, sangue, ossos e gorduras e são transformados em farinha animal para a produção de ração. Estima-se que o Brasil produza em média 4 milhões de toneladas de farinha animal por ano. Os efluentes líquidos são formados por águas utilizadas no abate, processamento de carnes e por isso apresentam quantidades variáveis de sangue e gordura. Estes efluentes líquidos são tratados

por flotação até separar as fases com os sólidos e a fase líquida propriamente dita (COLDEBELLA e SCHEUERMANN, 2009).

Segundo Pacheco (2006a), as etapas do tratamento de efluentes de frigoríficos são as seguintes: tratamento primário; equalização; tratamento secundário e tratamento terciário.

No tratamento primário ocorre a remoção de sólidos grosseiros por ação físico-mecânica com grades ou peneiras; na equalização há a minimização de eventuais sólidos em suspensão. Há a absorção significativa de vazões de cargas poluentes dos efluentes líquidos a serem tratados, permitindo a operação como um todo. No tratamento secundário ocorre a remoção de sólidos coloidais, emulsionados e dissolvidos por ação biológica. O tratamento secundário geralmente é realizado em lagoas de estabilização, como as lagoas anaeróbias. No tratamento terciário ocorre a remoção suplementar de sólidos, matéria orgânica e organismos patogênicos possivelmente existentes, com a adição de coagulantes ou utilização de sistemas biológicos (PACHECO, 2006a).

Os efluentes de frigoríficos geralmente apresentam duas linhas principais: a linha verde e a linha vermelha (Figura 3.1): os efluentes da linha verde possuem grande quantidade de sólidos, sendo assim, em grande parte dos casos o pré-tratamento consiste em peneiramento ou centrifugação, reduzindo a quantidade de sólidos no efluente e consequentemente a carga poluidora a ser tratada; Já os efluentes da linha vermelha possuem elevadas concentrações de gorduras e proteínas. O tratamento mais adequado é a flotação para a remoção de gorduras, pela formação do flotado industrial. As gorduras e proteínas removidas são reaproveitadas na graxaria como matéria-prima (PACHECO, 2006a).

3.1.1 Flotado industrial

A indústria frigorífica tem uma grande geração de efluentes, estimada em cerca de 149 milhões de toneladas ao ano. Estes efluentes são constituídos em geral por água do processamento de resíduos de sangue, gorduras e restos de carnes. A quantidade de água para abater um frango é da ordem de 30 litros e de um suíno aproximadamente 850 litros segundo último levantamento realizado pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 1995; BRASIL, 1999). Em geral, o tratamento ocorre com a adição de agentes coagulantes e subsequente processo de flotação, em que é possível separar a parte orgânica do efluente sob a forma de um lodo rico em proteínas e lipídeos. Esse lodo pode ser centrifugado para retirar o excesso de água e gordura existente, transformando o lodo em um composto orgânico denominado flotado industrial, que possui matéria seca na faixa de 35%. Estimativas dizem que a indústria

frigorífica produz aproximadamente 1 milhão de toneladas de flotado industrial ao ano (AGUILAR *et al.*, 2002).

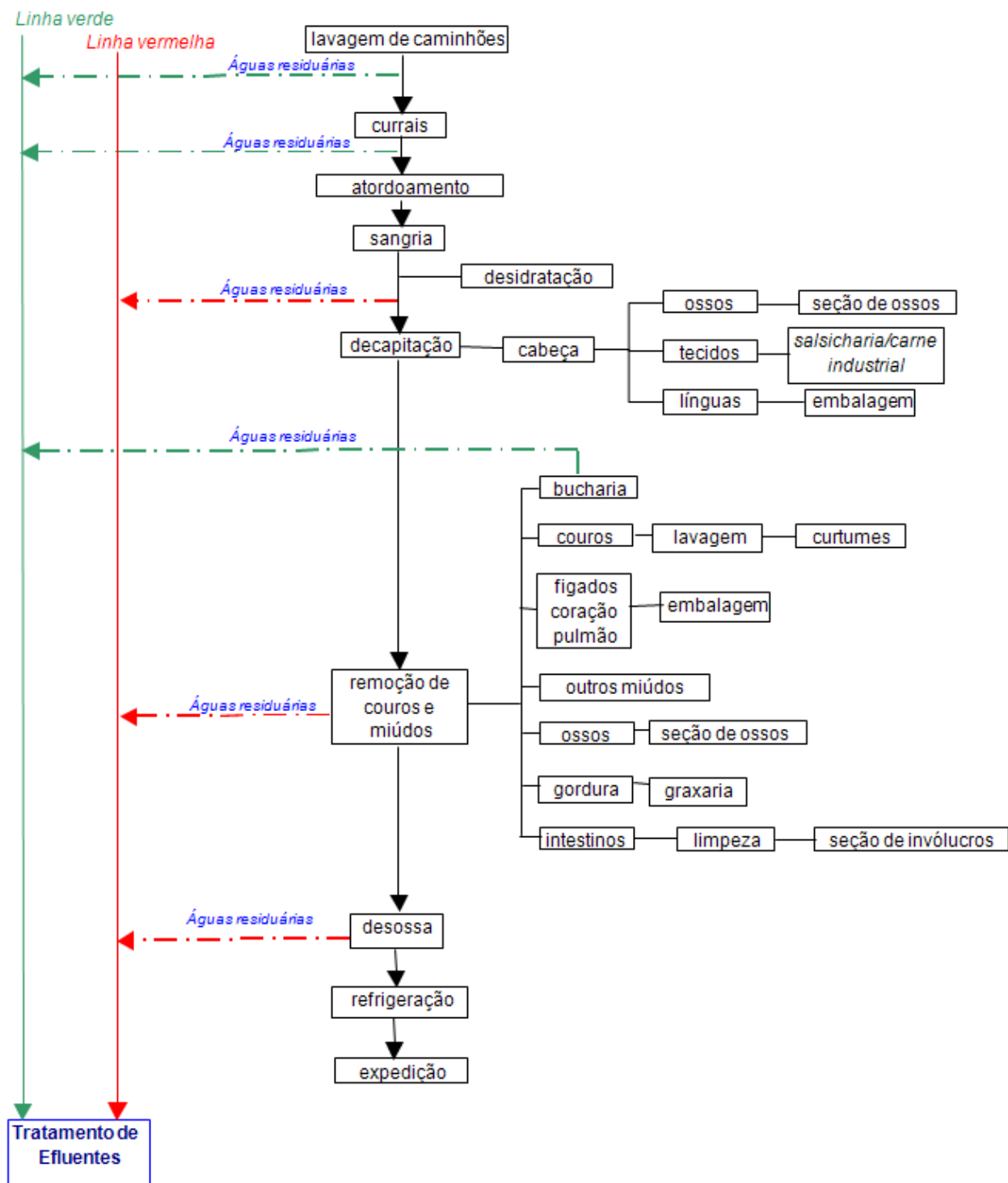


Fig. 3.1 - Fluxograma indústria frigorífica (PACHECO 2006a).

Os efluentes também são constituídos, em alguns frigoríficos, de esgoto sanitário e águas pluviais, captadas na indústria, em que a soma destes constituintes implica em uma

importante fonte de poluição de águas e, conseqüentemente, altos valores de DQO. Processos como recuperação do sangue, das gorduras e do conteúdo das vísceras podem reduzir substancialmente as cargas poluidoras e ainda produzir subprodutos rentáveis (CAVALCANTI e BRAILE, 1993; MAARTENS *et al.* 1996, RAJESHWARI *et al.*, 2000).

A formação do flotado industrial se dá com a adição de um polímero catiônico (poliacrilamida catiônica). Um dos polímeros comerciais conhecido por FLONEX 9045 é fabricado pela empresa SNF Floerger®, utilizado na concentração de 5 mg/L de efluente a receber tratamento (<http://www.snfbr.com>).

Zanotto *et al.* (2006) estudaram a composição do flotado industrial oriundo de um efluente frigorífico para determinar o teor de massa seca, proteína bruta, extrato etéreo, fibra bruta, cinzas, cálcio, fósforo, magnésio, cobre, ferro, manganês e zinco (Tabela 3.1)

Tab. 3.1 - Composição do Flotado Industrial (ZANOTTO *et al.*, 2006)

Itens analisados	Valor Médio	Intervalo de confiança de 95%	
		Valor Mínimo	Valor Máximo
Matéria seca (%)	35,12	33,88	36,36
Proteína bruta (%)	44,03	43,44	44,51
Extrato etéreo (%)*	32,74	31,78	33,70
Fibra bruta (%)	1,92	1,79	2,04
Cinzas (%)	5,43	5,22	5,64
Cálcio (%)	1,03	0,96	1,10
Fósforo (%)	1,03	1,00	1,05
Magnésio (%)	0,17	0,13	0,21
Cobre (mg/Kg)	164,42	98,57	230,26
Ferro (mg/Kg)	2511,12	2059,27	2962,97
Manganês (mg/Kg)	165,01	98,13	231,88
Zinco (mg/Kg)	434,05	265,48	602,63

*correspondente à lipídeos.

Segundo Zanotto *et al.* (2006), os elevados valores de proteína bruta e extrato etéreo indicam que o flotado industrial é uma possível matéria-prima para fabricação de ingredientes de origem animal, como rações.

Silva *et al.* (2007) estudaram a flotação de um efluente frigorífico e concluíram que com o processo de flotação teve eficiência de 78% de remoção de turbidez, 53% de remoção

de DQO e 68% de remoção de óleos e graxas. Foi utilizado cloreto férrico na dosagem de 30 a 70 mL para coagulação e floculante a 2 mg/L.

Segundo Pacheco (2006b) a indústria frigorífica acarreta volumes significativos de efluentes, caracterizados principalmente por possuírem uma alta carga orgânica (gorduras) e altos teores de nitrogênio e fósforo, pois estes efluentes são constituídos por fragmentos de carnes, de gorduras, de vísceras e de tecidos orgânicos diversos. Conforme Pacheco e Yamanaka (2006), para minimizar os impactos ambientais de seus efluentes e atenderem às legislações ambientais, há a necessidade de um correto tratamento destes.

A Tabela 3.2 mostra alguns valores médios de cargas e concentração de poluentes gerados na indústria frigorífica.

Tab. 3.2 - Cargas e concentrações de poluentes da indústria frigorífica (CETESB, 1993)

Parâmetro	Carga (Kg/t matéria-prima)	Concentração (mg/L)
Sólidos em suspensão	0,018	61
Sólidos dissolvidos totais	0,21	201
Óleos e graxas	0,14	109
Nitrogênio total	0,17	493
Nitrato	0,081	263
Fósforo Total	0,0021	6,3

3.2 - Surfactantes e biossurfactantes

Segundo Kronemberger 2007, os surfactantes são moléculas tensoativas que tem como principal função fisiológica permitir o crescimento de micro-organismos em substratos imiscíveis em água devido à redução da tensão superficial, o que torna o substrato livre para assimilação e metabolização pelo micro-organismo.

Os surfactantes naturais (biossurfactantes) são metabólitos microbianos, com moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas que se distribuem nas interfaces entre as fases fluídas com diferentes graus de polaridade, proporcionando fator de redução da tensão superficial e interfacial de substâncias aquosas (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

A utilização de micro-organismos na produção de surfactantes representa um progresso, já que os micro-organismos são capazes de agir em um vasto campo de aplicação, de acordo com a Tabela 3.3 (PIRÔLLO, 2006).

Pirôllo (2006) defende a utilização dos biossurfactantes no lugar dos surfactantes químicos por possuírem: biocompatibilidade em diversas aplicações, como por exemplo em aditivos de alimentos; especificidade de aplicações por serem moléculas orgânicas complexas com grupos funcionais específicos; eficiência em diversas condições de pH, temperatura e salinidade.

Tab. 3.3 - Aplicações dos biossurfactantes (PIRÔLLO, 2006)

Funções	Campos de Aplicações
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos e alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza e agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de Vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Redutores de Viscosidade	Transporte em tubulações e oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água e calcário-água
Fungicidas	Controle biológico de fitopatógenos

Os biossurfactantes podem apresentar diversas estruturas, como vesículas esféricas, micelas e estruturas laminares (Figura 3.2), que se acumulam em interfaces que possuem polaridades diferentes, o que proporciona que os biossurfactantes possuam a propriedade de reduzir as tensões superficial ou interfacial devido um remanejamento molecular, influenciando as ligações hidrofóbicas e hidrofílicas (COLLA, 2003).

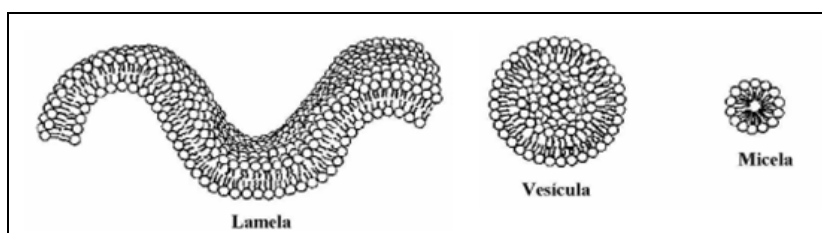


Fig. 3.2 - Estruturas dos biossurfactantes (COLLA, 2003)

Dentre os tipos de surfactantes tem-se os glicolípídeos, que se dividem em trealose, soforolípídeos e raminolípídeos (COLLA, 2003). Segundo a definição de Homberg (2001), os glicolípídeos são hidroxí-ácidos graxos ligados a uma molécula de açúcar através de uma ligação glicosídica. Nesta definição somente se enquadra os raminolípídeos e os soforolípídeos.

A produção de biossurfactantes vem ocorrendo a partir de vários substratos como é o caso de óleos residuais de fritura e resíduos de óleo de girassol. Mesmo com todo o avanço da ciência, pesquisadores ainda enfrentam o problema de dosar o equilíbrio entre carboidratos e lipídeos com o crescimento ideal para o micro-organismo, consequentemente, para a produção de biossurfactante. (NAWAWI *et al.*, 2010).

3.2.1 - Tipos de Biossurfactantes

A composição de um biossurfactante é variável conforme o micro-organismo, pH em que atua, nutrientes, substratos e temperatura utilizados, apresentando diversas estruturas químicas, segundo Desai e Banat (1997).

Piróllo (2006) apresenta uma listagem com as principais classes de biossurfactantes e micro-organismos envolvidos (Tabela 3.4).

Tab. 3.4- Tipos de biossurfactante e micro-organismos produtores (PIRÔLLO, 2006)

Tipos de biossurfactante	Micro-organismo
GLICOLIPÍDEOS	
Raminolípídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolípídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apícola</i>
Trealolípídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium</i> sp.
LIPOPEPTÍDEOS E LIPOPROTEÍNAS	
Peptídeo-lípídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
ÁCIDOS GRAXOS, LIPÍDEOS NEUTROS E FOSFOLIPÍDEOS	
Ácidos Graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>

Lipídeos Neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
SURFACTANTES POLIMÉRICOS	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Manana-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
SURFACTANTES PARTICULADOS	
Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Células	Várias bactérias

Mukherjee *et al.* (2006) classifica os biossurfactantes em um grupo que compreende os biossurfactantes com baixa massa molecular, em que estão os glicolipídeos e lipopeptídeos e os demais tipos de biossurfactantes no grupo de compostos com elevada massa molecular, como os surfactantes poliméricos.

3.2.1.1 - Glicolipídeos:

Segundo Desai e Banat (1997) os glicolipídeos são os surfactantes microbianos mais estudados, sendo formados por uma longa cadeia de ácidos alifáticos ou hidróxi-ácidos ligados a uma ou duas moléculas de raminose. Dentre os glicolipídeos tem-se os raminolipídeos, produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, sendo esta produção primeiramente citada por Jarvis e Johnson (1949).

Kitamoto *et al.* (2002) estudaram as principais funções e aplicações potenciais dos glicolipídeos, em que há destaque para os biossurfactantes por possuírem menor toxicidade em relação a seus homólogos químicos.

O raminolipídeo do tipo I, denominado L-ramnosil-L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (Figura 3.3) e tipo II, L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (Figura 3.4) são os principais glicolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (HELVACI *et al.*, 2004).

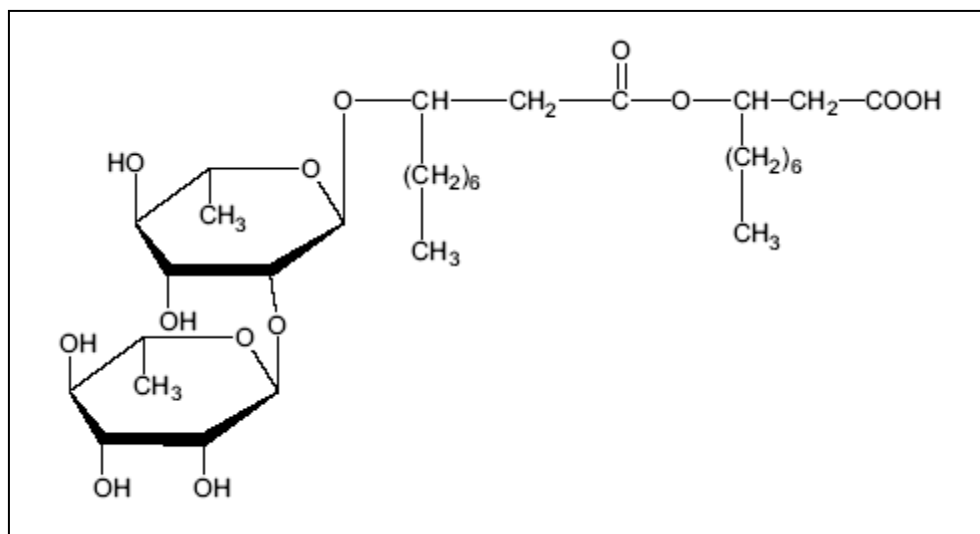


Fig. 3.3 - Estrutura do raminolípídeo tipo I produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (DESAI e BANAT, 1997)

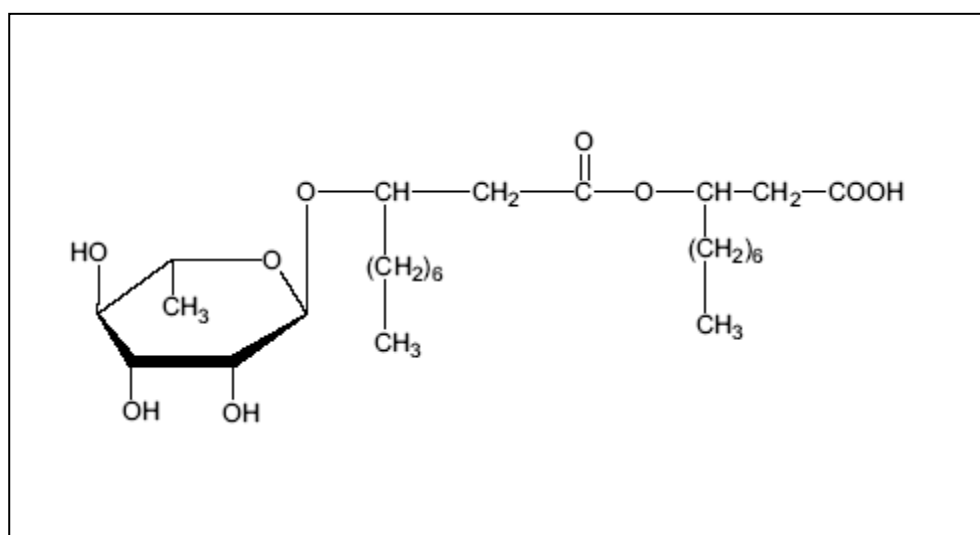


Fig. 3.4 - Estrutura do raminolípídeo tipo II produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (DESAI e BANAT, 1997)

Raminolípídeos foram estudados por Rahman *et al.* (2003) para verificar possíveis métodos que aumentassem a taxa de biodegradação da borra de petróleo, fazendo com que assim tivessem uma redução no tempo da biorremediação. A conclusão foi que o solo contaminado onde foi utilizado raminolípídeos no tratamento promoveu um aumento da disponibilidade dos compostos para os micro-organismos usados na biorremediação.

Guo-Liang *et al.* (2005) também estudaram a biodegradação de petróleo cru na presença dos raminolípídeos e *Pseudomonas aeruginosa* e perceberam que com a adição de 0,22 g/L de raminolípídeo obteve uma degradação acima de 58% de todo o petróleo, pois os raminolípídeos facilitaram o acesso das bactérias ao petróleo.

A produção de raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* também foi estudada por Juwarkar *et al.* (2007), em que o foco do estudo foi a remoção de cádmio e chumbo de solos contaminados. Utilizando uma solução com 0,1% de raminolipídeo de *Pseudomonas aeruginosa* conseguiram uma remoção de 92% de cádmio e 88% de chumbo em testes durante um período de 36 horas. A remoção destes metais do solo utilizando somente água pura obteve a remoção de cádmio e chumbo, respectivamente, de 2,7% e 9,8%.

Os raminolipídeos apresentam uma baixa toxicidade em relação aos surfactantes químicos. Por exemplo, o raminolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em comparação com um surfactante químico apresentou uma toxicidade 10 vezes menor (SANTA ANNA *et al.* 2007).

O uso de raminolipídeos no tratamento de queimaduras também foi estudado por Stipcevic *et al.* (2006), em que fazendo o tratamento destas em alguns ratos com solução de 0,1% de raminolipídeo obteve-se uma melhor cicatrização, em torno de 35 dias. Os ratos não tratados estiveram com o ferimento em torno de 45 dias.

A produção de um raminolipídeo pela linhagem *Pseudomonas aeruginosa* LBI a partir da fermentação de resíduos da fabricação do óleo de girassol foi estudada por Fernandes *et al.* (2005) em fermentação por 48 horas, em que foi obtido 12,1 g/L de raminolipídeos.

Já os soforolipídeos (Figura 3.5) são formados por molécula de soforose ligada a uma longa cadeia de ácido graxo hidroxilado.

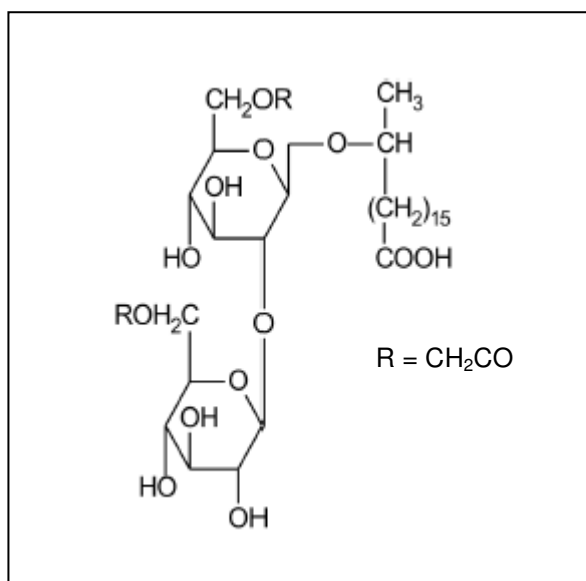


Fig.3.5- Estrutura do soforolipídeo produzido por *Torulopsis bombicola* (DESAI e BANAT, 1997)

Os soforolipídeos exibem excelente biodegradabilidade e produtividade de até 300 g/L, conforme a produção de ésteres soforolipídeos estudada por Shin *et al.* (2010) utilizando óleo de cozinha como substrato em *Candida bombicola* ATCC 22214.

A produção de soforolipídeos induz a produção de celulase em culturas de *Candida bombicola*, cultivadas em glicerol como fonte de carbono. A celulase é um grupo de enzimas que podem hidrolisar a celulose sólida para a glicose. Uma grande escala de produção de celulase é importante para uma economia global de uma biorefinaria a partir de materiais lignocelulósicos (JU e LO, 2009).

O efeito da composição do meio de cultura sobre a estrutura e estado físico de soforolipídeos produzidos por *Candida bombicola* ATCC 22214 foi investigado por Cooper e Cavaleiro (2003). Mesmo que a produção de soforolipídeos ocorra em presença de substratos de carboidratos simples, melhores rendimentos ocorrem quando um substrato hidrofóbico adicional é fornecido, segundo Hommel *et al.* (1994).

A produção de soforolipídeos pela levedura *Candida bombicola* utilizando substratos simples e de baixo custo no processo fermentativo foi investigada por Pakshirajan e Daverey (2009). Os substratos utilizados foram o melaço de cana-de-açúcar, óleo de soja, de girassol e azeite de oliva, em 5 dias de fermentação, proporcionando uma produtividade máxima de soforolipídeos de 23,23 g/L, sendo uma produtividade comparável à obtida quando substratos convencionais são utilizados, como extrato de levedura e uréia.

Os trealolipídeos (Figura 3.6) são formados pela ligação do dissacarídeo trealose ligado a 2 moléculas de ácido β -hidroxicarboxílico de cadeia longa e ramificada. Os trealolipídeos são sintetizados por diferentes espécies de actinomicetos e a composição é influenciada pelas condições de cultivo (DESAI, 1987).

3.4.1.2 - Lipopeptídeos e lipoproteínas:

Os lipopeptídeos são produzidos pelo gênero de bactérias *Bacillus* e estes apresentam alta eficiência como tensoativos (FIECHTER, 1992). Segundo Vollbrecht (1998), existem lipopeptídeos que possuem atividades biológicas funcionando como antibactericidas e antivirais.

A surfactina (Fig. 3.7) é um tipo de lipopeptídeo produzido por linhagens de *B. subtilis*, que é um dos biossurfactantes mais conhecidos desta classificação (REIS *et al.*, 2004). A surfactina é um lipopeptídeo cíclico formado por uma cadeia com sete aminoácidos e suas extremidades ligadas a grupamentos carboxila e hidroxila de ácido graxo β -hidroxilado, variando esta cadeia de 13 a 15 átomos (LANG, 2002).

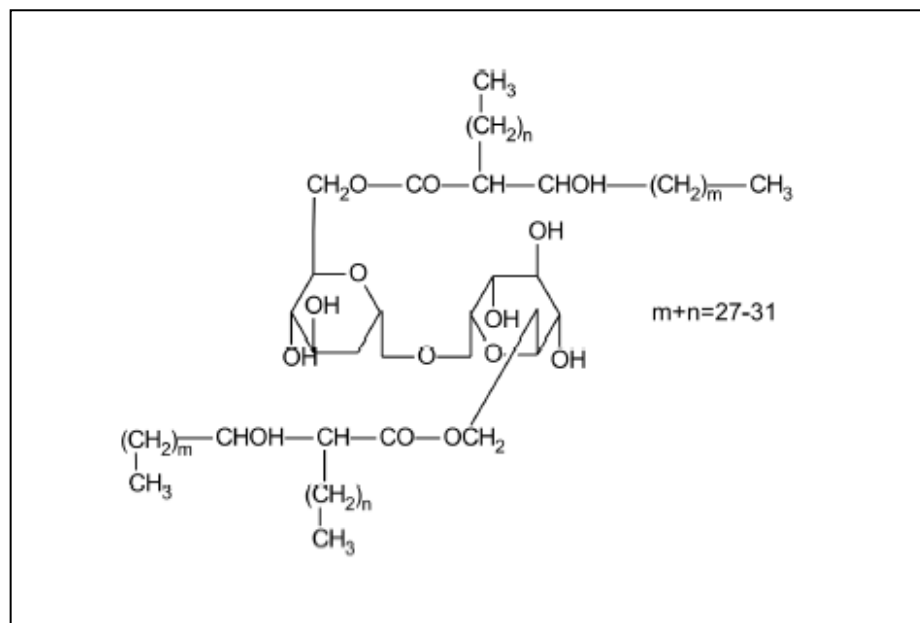


Fig. 3.6 - Estrutura do trealolípido produzido por *Rhodococcus erythropolis* (DESAI e BANAT, 1997)

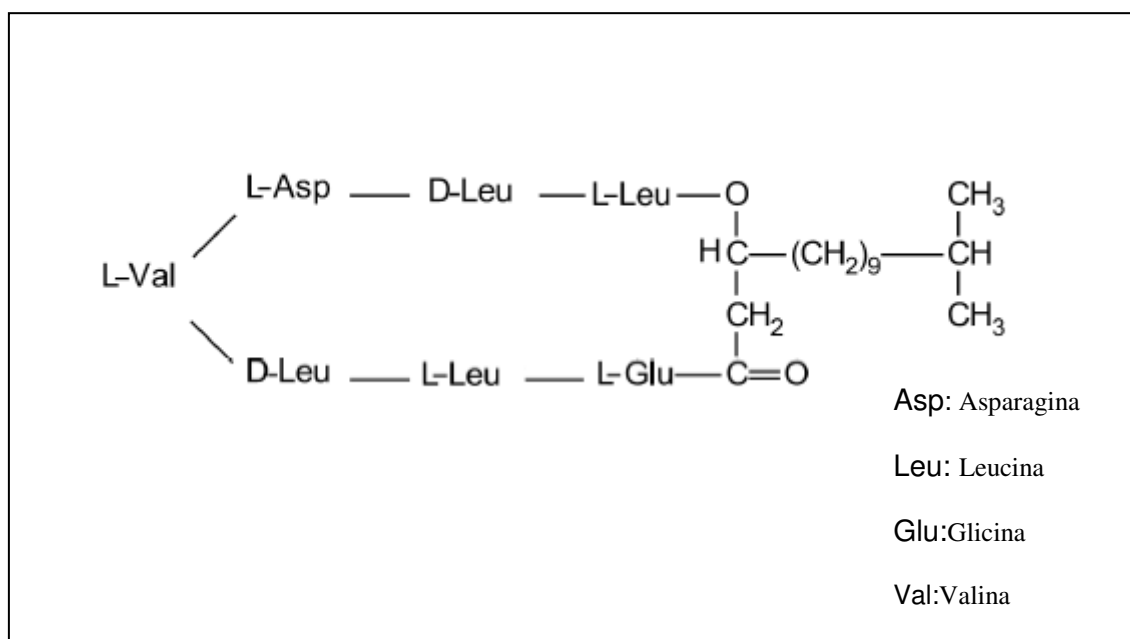


Fig. 3.7 - Estrutura do lipopeptídeo surfactina produzido por *Bacillus subtilis* (BARROS *et al.*, 2007)

Os biossurfactantes produzidos por *Baccillus* sp. são estáveis em concentrações de NaCl de 2 a 3% (BARROS *et al.*, 2007). Estes autores relatam que os lipopeptídeos são capazes de alterar as propriedades físicas e químicas das interfaces de soluções aquosas.

Os lipopeptídeos atuam na membrana celular de micro-organismos de maneira semelhante a dos surfactantes sintéticos (CAMEOTRA E MAKAR, 1998).

3.2.1.3 - Ácidos graxos e fosfolipídeos:

Os fosfolipídeos (Figura 3.8) fazem parte da estrutura de membranas de micro-organismos, e são formados por uma molécula de glicerol ligada a duas moléculas de ácidos graxos por uma ligação éster. Também são ligados a um grupamento fosfato e este grupamento pode apresentar diferentes constituintes, segundo Zajic e Seffens (1984).

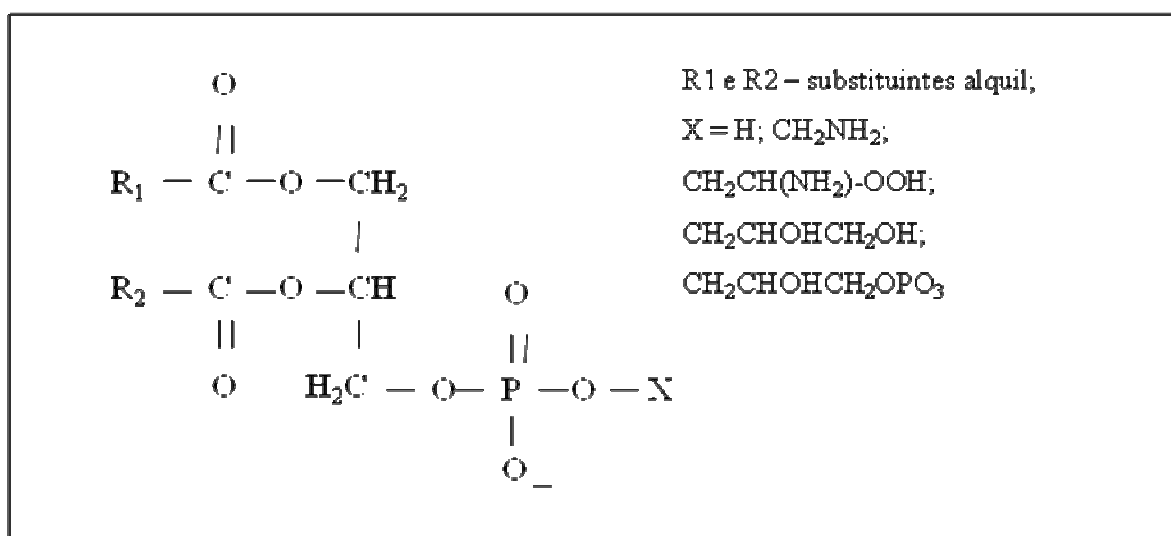


Fig. 3.8 - Estrutura do fosfolipídeo (COOPER E ZAJIC, 1980)

Assim como na produção dos glicolipídeos, a produção de fosfolipídeos também é influenciada pelas condições em que a fermentação ocorre, bem como pelo tipo de substrato que se utiliza como fonte de carbono, podendo ser produzido diferentes tipos de fosfolipídeos (DESAI e BANAT, 1997). Os principais tipos de fosfolipídeos: fosfatidiliositol, fosfatidiglicerol e ácido fosfatídico (COOPER E ZAJIC, 1980).

3.2.1.4 - Poliméricos:

Os biossurfactantes poliméricos apresentam alta afinidade por interfaces óleo/água, facilitando a formação de emulsões estáveis, fazendo com que mesmo em baixas concentrações sejam alcançados elevados índices de emulsificações (KOSARIC *et al.*, 1987).

Dentre os biossurfactantes poliméricos disponíveis no mercado tem-se o Emulsan (Figura 3.9) e o Liposan, possuindo alto poder emulsificante (KARANTH *et al.*, 1999).

Segundo Cirigliano e Carman (1984), no Emulsan ácidos graxos estão ligados a um esqueleto de heteropolissacarídeos e o Liposan é constituído de carboidratos e proteínas.

Um biossurfactante polimérico produzido por *Acinetobacter radioresistens* KA-53 foi estudado por Navon-Venezia *et al.* (1995), recebendo a denominação “Alasan”. Este biossurfactante possui atividade dispersante até 3 vezes maior quando seu uso ocorre em soluções neutras ou alcalinas.

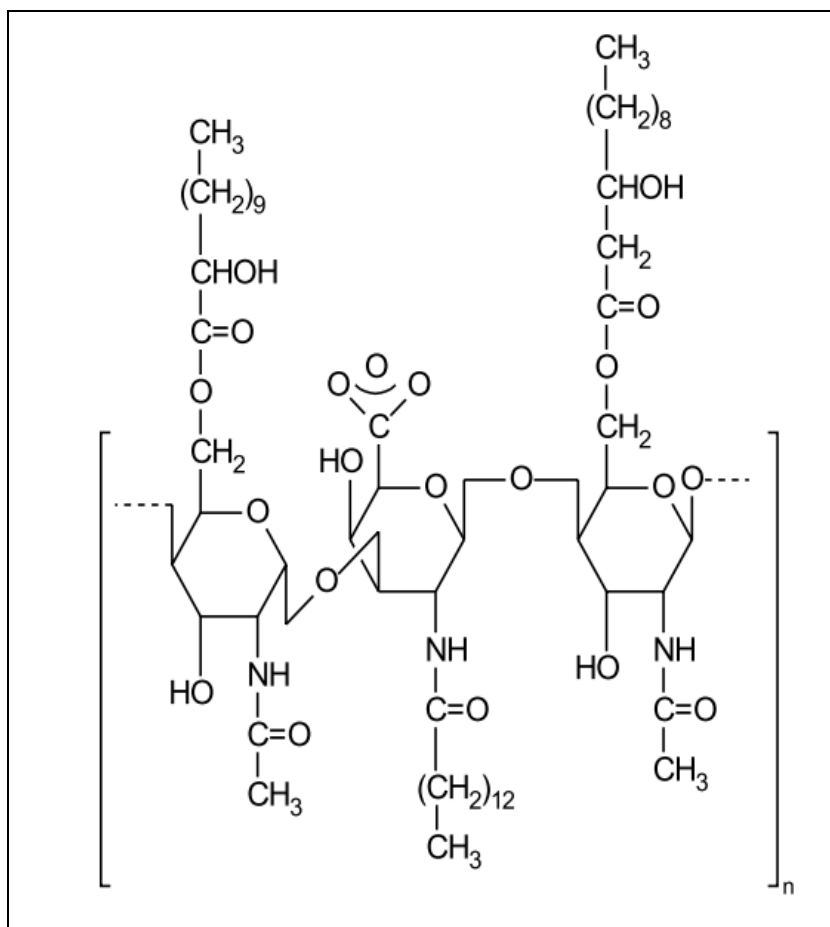


Fig. 3.9 - Estrutura do surfactante polimérico Emulsan produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* (NITSCHKE e PASTORE, 2002)

3.2.1.5 - Particulados:

Os biossurfactantes particulados são vesículas e células microbianas com atividade surfactante. Existem células microbianas com elevada hidrofobicidade superficial, sendo consideradas biossurfactantes, como alguns micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos, por exemplo espécies de *Cyanobacteria* e *Serratia* sp. As bactérias do gênero *Acinetobacter* sp. produzem vesículas extracelulares (DESAI e BANAT, 1997).

3.2.2 - Propriedades gerais e funções dos biossurfactantes

Os biossurfactantes apresentam várias funções fisiológicas, sendo descritas abaixo (NITSCHKE e PASTORE, 2002):

- Solubilização de hidrocarbonetos insolúveis em água e emulsificação;
- Aderência e liberação da célula à superfície: relacionada à estratégia de sobrevivência de micro-organismos, que é a de colonizar um nicho ecológico em que este micro-organismo tenha condições de sobrevivência. Os micro-organismos podem utilizar os surfactantes ligados à sua parede celular para se aderirem em um determinado local, conforme sua necessidade, buscando meios mais favoráveis à sua sobrevivência;
- Atividade antibiótica: como os raminolipídeos oriundos de *Pseudomonas aeruginosa*, em que com estes surfactantes os micro-organismos ganham maior chance de sobrevivência e maior competitividade por nutrientes;
- Facilitar o transporte de hidrocarbonetos: função atribuída aos biossurfactantes que estão ligados à parede celular de *Torulopsis tropicalis*;

Uma outra função do biossurfactante, principalmente os lipopeptídeos, segundo Kitamoto *et al.* (2002), é funcionar como “agente de dispersão” quando micro-organismos patogênicos infectam plantas ou animais, bem como “agente umectante” para a superfície de células hospedeiras.

A aderência e liberação da célula a superfícies é uma propriedade dos biossurfactantes mencionada por Ron e Rosenberg (2002), em que os micro-organismos podem utilizar surfactantes ligados à parede celular para regular suas propriedades da superfície celular, buscando a aderência ou não de um local conforme a necessidade de encontrar novos habitats com condições mais favoráveis à disponibilidade de nutrientes.

Os surfactantes, químicos ou biológicos reduzem a tensão superficial do meio aquoso. Essa tensão superficial é o aumento das forças atrativas intermoleculares na superfície do meio. Sabe-se que os líquidos apresentam a tendência de adotar uma forma que diminua sua área de superfície para que as moléculas se mantenham juntas em um maior número possível. Gotas de líquidos tendem a assumir um formato que apresente uma menor razão superfície/volume, e este formato é o esférico. Sabe-se que as forças de coesão entre as moléculas de um meio aquoso são compartilhadas com átomos vizinhos e, aquelas que não têm átomos vizinhos acima delas apresentam uma maior força de atração com seus “vizinhos” mais próximos, conforme Figura 3.10 (PIRÔLLO, 2006).

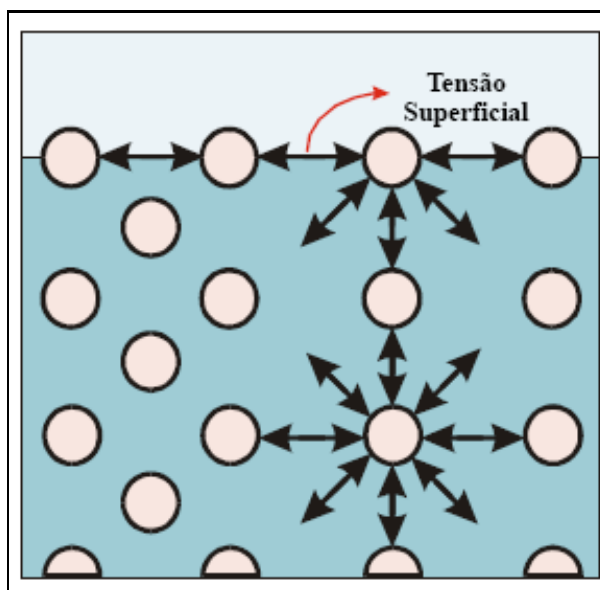


Fig. 3.10 - Forças intermoleculares no interior e na superfície de um líquido (PIRÔLLO, 2006)

A tensão superficial de um meio aquoso pode ser medida com o auxílio de um tensiômetro. Para ilustrar o efeito de um biossurfactante, Kronemberger (2007) mostrou que a tensão superficial da água destilada é aproximadamente igual a 72 mN/m, mas a adição de surfactantes pode reduzir este valor para 30 mN/m. Ainda para este autor, a utilização de um surfactante (químico ou biológico) reduz a tensão superficial até um valor crítico, em que a partir deste valor as moléculas do surfactante se associam e formam estruturas supramoleculares, como por exemplo as micelas, e pode-se chamar este valor de CMC, que é a concentração micelar crítica, que tem como objetivo medir a eficiência do surfactante em questão.

3.2.3 - Produção de biossurfactantes

Normalmente a produção de biossurfactantes ocorre quando os substratos do meio são compostos insolúveis, como hidrocarbonetos. Para o primeiro passo para formação dos biossurfactantes há a formação de moléculas que constituirão as partes hidrofílicas e hidrofóbicas do composto, e segundo Colla (2003) todo o processo pode ocorrer pela:

- assimilação de hidrocarbonetos que estão na solução aquosa;
- pelo contato direto entre micro-organismo e substrato, formando agregados celulares, ar e gotas de hidrocarbonetos, em que tem-se um aumento da lipoficidade da superfície celular devido as camadas lipofílicas;

- pela assimilação do hidrocarboneto emulsificado, no qual pelo contato com a célula, ocorre a conversão do substrato em pequenas gotículas, o que gera uma pseudo-solubilização.

A produção de um biossurfactante envolve os processos de concentração, recuperação e purificação do produto final (SARACHAT *et al.*, 2009).

Após o contato entre a célula e o substrato, Colla (2003) afirma que os hidrocarbonetos são oxidados a alcoóis, seguido de uma oxidação a aldeídos e ácidos graxos.

Maximizar o rendimento na produção de um biossurfactante significa alcançar altas taxas de concentrações finais do produto em menor tempo possível, mas estabelecer um modelo para tal é complicado devido a composição que cada biossurfactante possui, dependendo da cultura microbiana utilizada e determinadas condições de produção (LIN, 1996).

A maioria dos biossurfactantes pode ser recuperada facilmente após o processo de fermentação da cultura de micro-organismos a partir de técnicas como a precipitação, cristalização ou centrifugação (SARACHAT *et al.*, 2009).

A produção dos biossurfactantes é influenciada devido as fontes de carbono, concentração de nitrogênio, fósforo, manganês e ferro no meio, além dos fatores como pH e temperatura (PIRÔLLO, 2006).

A fonte de carbono para produção de um biossurfactante pode ser escolhida pelo custo e pela forma de aplicabilidade que pretende utilizar o produto final. Essa fonte de carbono é importante no processo de fermentação devido fornecer características à estrutura do biossurfactante (ALMEIDA, 2002).

Muitos micro-organismos podem ser produtores de biossurfactantes para uma variedade de substratos, porém, cada biossurfactantes apresenta características bioquímicas e estruturais conforme o substrato utilizado (BANAT *et al.* 2010).

Ferraz *et al.* (2010) pesquisaram a produção de biossurfactantes utilizando o resíduo de mandioca manípueira integral e pré-tratada. Os melhores resultados foram obtidos com os isolados LB19 no meio integral e LB17 no meio pré-tratado.

Wu *et al.* (2007) isolaram *Pseudomonas aeruginosa* em diferentes fontes de carbono (glicose, óleo vegetal e ácidos graxos) e de nitrogênio (uréia e nitrato de amônio), pois segundo Maier e Chavez (2009) , tanto a fonte de carbono quanto a fonte de nitrogênio afetam a produção de ramnilipídeo. A glicose e glicerol foram eficazes como fontes de carbono, tendo em uma fermentação a quantidade de ramnilipídeo respectivamente para cada fonte de 7,50 g/L e 4,93 g/L. A tensão superficial após a produção do ramnilipídeo foi de

26,5 dina/cm e foram obtidos índices de emulsificação acima de 70%. Nos estudos de Wu *et al.* (2007), a linhagem *Pseudomonas aeruginosa* EM1 não foi capaz de utilizar eficientemente a sacarose como substrato para a produção de raminolipídeo, quando foi alcançada a concentração de 0,06 g/L. A fonte de nitrogênio mais eficiente para *Pseudomonas aeruginosa* EM1 foi NaNO_3 proporcionando um rendimento de raminolipídeos de 8,63 g/L.

Pseudomonas fluorescens foram utilizadas para a produção de um biossurfactante, estudando a influência da concentração de nitrogênio. Nitrato de sódio e nitrato de amônio foram as melhores fontes de nitrogênio, proporcionando melhor crescimento da biomassa, respectivamente de 3,3 g/L e 2,2 g/L (ABOUSEOUD *et al.*, 2007)

Biossurfactantes também já foram produzidos por fermentação em águas residuárias contendo óleo como fonte de carbono e *Pseudomonas aeruginosa* S6, e segundo Yin *et al.* (2008) apresentam um potencial para utilização em biorremediação de contaminação de óleo bruto de petróleo. A linhagem *Pseudomonas aeruginosa* SP4 conseguiu uma redução da tensão superficial da água de 72 dina/cm para 33,9 dina/cm.

A produção de biossurfactantes é influenciada não só pelas fontes de carbono e nitrogênio, mas pela presença de fósforo, ferro, manganês e magnésio no meio de produção. Além disso, fatores operacionais, como temperatura e velocidade de agitação durante a fermentação também podem interferir na produção (FONTES *et al.*, 2008).

Wei *et al.* (2005) produziram um raminolipídeo utilizando *Pseudomonas aeruginosa* J4 a partir de uma variedade de substratos de carbono (glicose, glicerol, óleo de oliva) A produção foi controlado com temperatura de 30°C e velocidade de agitação 200 rpm. A taxa de produção do raminolipídeo foi influenciada pela fonte de carbono. Com glicose e glicerol obteve-se 1400 a 2100 mg/L para a concentração do raminolipídeo, enquanto que quando a produção ocorreu com azeite de oliva, a concentração do raminolipídeo obteve-se uma maior produção, de até 3600 mg/L, com índices de emulsificação entre 70 e 78%.

Cha *et al.* (2007) produziram biossurfactante utilizando uma nova linhagem de bactéria isolada de lodo ativado, identificada como *Pseudomonas aeruginosa* EMS1, cultivada em óleo de soja acidificado como fonte de carbono, residual de frituras. Obteve-se a produção máxima de 5g/L de biossurfactante utilizando a composição do meio de 2% de óleo de soja acidificado, 0,3% de NH_4NO_3 , 0,03% de solução KH_2PO_4 e a mesma quantidade de K_2HPO_4 , 0,02% sulfato de magnésio hepta-hidratado, e 0,025% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, com fermentação sob agitação a 200 rpm em um período de 100 horas a 30°C. Nesta fermentação, a produção do biossurfactante foi uma função do crescimento celular, com uma produção máxima durante a fase exponencial de crescimento. Pornsunthorntawee *et al.* (2009)

estudaram as propriedades da formação de raminolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* SP4 com fermentação em óleo de palma por 48 horas e velocidade de agitação 200 rpm. Para Pornsunthorntawee *et al.* (2009) esta linhagem produz vários raminolipídeos, em que entre os principais está o L-ramnosil-3-hidroxidecanoil-3-hidroxidecanoato. As propriedades do biossurfactante foram investigadas em uma solução tampão de pH 7,4. O ponto máximo de obtenção da concentração do biossurfactante foi de 2700 mg/L, ocasionando redução da tensão superficial do meio para 30mN/m. A produção de raminolipídeos também foi estudada por Benincasa e Accorsini (2008), utilizando *Pseudomonas aeruginosa* LBI cultivada em resíduos provenientes do processamento do óleo de girassol. A concentração de raminolipídeos obtida chegou a 7,3 g/L.

A técnica de fracionamento em coluna de espuma foi utilizada por Sarachat *et al.* (2009) para purificação e concentração de um biossurfactante produzido a partir do óleo de palma com *Pseudomonas aeruginosa* SP4. Os efeitos da vazão de ar e tempo de operação no processo foram estudados, em que a melhor taxa de fluxo de ar foi de 30mL/min e um tempo de operação de 4 horas, recuperando 97% do biossurfactante produzido.

Wei *et al.* (2008) estudaram a produção de raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* J16 utilizando glicerol como fonte de carbono e cloreto de amônio como fonte de nitrogênio, chegando a 4,67 g/L de raminose produzida.

A síntese de biossurfactantes também vem sendo produzida utilizando enzimas microbianas, tornando assim a produção contínua e de fácil recuperação. Várias reações enzimáticas vem sendo estudadas, e as preocupações são com a incidência sobre a síntese de ésteres de ácidos graxos de açúcar pela esterificação de carboidratos (YAHYA *et al.*, 1999).

Segundo Yan *et al.* (2001) embora o método enzimático para a produção de biossurfactantes tenha vantagens em comparação com o método de fermentação, ainda existem algumas dificuldades como a estabilidade, a atividade da enzima e a solubilidade do substrato.

Para Bounsuet *et al.* (1999), a escolha de produzir um biossurfactante por fermentação ou método enzimático ocorre conforme o objetivo do biossurfactante desejado. A fermentação é o método mais adequado para a aplicação em tratamentos ambientais, pois a pureza do produto não é necessariamente exigida, como nos casos de recuperação de óleo e biorremediação. No entanto, para a aplicação em especialidades químicas e farmacêuticas, o método enzimático, em que o produto pode ser facilmente purificado, torna-se mais recomendável. Uma produção de um glicolipídeo pelo método enzimático é a síntese do butil-L-glicosídeo a partir da maltose.

Rodrigues *et al.* (2006) estudaram a cinética da produção de biossurfactante produzido por linhagens de *Lactobacillus*, em que para esta linhagem a produção se inicia nas primeiras 4 horas de fermentação, com um valor mínimo da tensão superficial de 39,5 mN/m para *Lactobacillus pentosus* CECT-4023, com uma concentração final de 1,4 g de biossurfactante/L ao final de 72 horas de fermentação.

Oliveira *et al.* (2008) estudaram a produção de raminolipídeos por uma linhagem de *Pseudomonas alcaligenes* a partir do óleo de palma como fonte de carbono, por ser uma fonte renovável. A produção do biossurfactante sofreu maior influência conforme a concentração do óleo de palma, em fermentação por 48 horas com velocidade de agitação de 220 rpm e pH 7,0. A melhor produção de biossurfactantes ocorre em 2,3 g/L produzidos de raminolipídeos e índices de emulsificação acima de 70% em querosene de aviação. Um aumento gradual na concentração de raminolipídeos levou a uma menor tensão superficial, chegando a 31 mN/m. Para o mesmo autor, em pesquisas sobre o potencial de emulsificação de um biossurfactante produzido por *Rhodococcus* sp. com diversos hidrocarbonetos como fonte de carbono (substrato), como resultado da síntese do biossurfactante, a tensão superficial do meio foi reduzida de 68 mN/m para valores abaixo de 30 mN/m e o biossurfactante foi capaz de formar emulsões estáveis com 90% de índice de emulsificação. Segundo Oliveira *et al.* (2008) o índice de emulsificação de um biossurfactante depende da interação direta da porção hidrofóbica do biossurfactante com os substratos (hidrocarbonetos).

Jamal *et al.* (2010) estudaram a produção de biossurfactante a partir do óleo de palma, com teor de ácido graxo no intervalo de 21 a 25%, em fermentação com 180 rpm a 30°C, com uma cultura mista de micro-organismos. A tensão superficial inicial da produção do meio antes da inoculação foi de 54,5 mN/m e a diminuição da tensão superficial esteve aliada ao crescimento microbiano, que teve o valor mínimo de 30,1 mN/m. A emulsificação foi causada pela contínua agitação, o que contribuiu para uma redução da tensão superficial.

A caracterização estrutural de um raminolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* MR01 é relatada por Noghabi *et al.* (2010), em que 77,2% do biossurfactante produzido foi composto por um mono-raminolipídeo e 22,8% por um di-raminolipídeo, em fermentação por 48 horas, na qual produziu-se 5,5 g/L de raminolipídeo e teve um índice de emulsificação de 65%. Sobre o crescimento celular, é atingido a fase estacionária e mesmo assim a produção do raminolipídeo continua até as 48 horas.

3.2.4 - Aplicações

A maior utilização dos biossurfactantes ainda é na indústria petrolífera, os quais são incorporados em formulações de óleos lubrificantes. Contudo, as aplicações se dividem em diversas áreas (NITSCHKE e PASTORE, 2002):

- biorremediação: os biossurfactantes aumentam a interação entre água e óleo, acelerando a degradação por micro-organismos no ambiente;
- limpeza de reservatórios de óleos: os biossurfactantes diminuem a viscosidade dos resíduos de óleos que ficam sedimentados no fundo de tanques de estocagem e que assim, seriam difíceis de serem removidos por um bombeamento normal. Com uma viscosidade menor, o bombeamento destes resíduos é facilitado.

Para Pinto e Martins (2009) os biossurfactantes também podem ser utilizados na melhora da recuperação de óleos e transferência de óleo cru.

Biossurfactantes também podem ser utilizados na indústria de alimento, segundo Desai e Banat (1997), principalmente devido à característica de formação e estabilização de emulsões, sendo utilizados como emulsificantes em alimentos (KACHHOLTZ e SCHLINGMANN, 1987).

Para Banat (2000) outras aplicações para os emulsificantes podem ser descritas, como melhorar a consistência e textura de produtos a base de gorduras e em solubilização de aromas.

Segundo Kitamoto *et al.* (2002) mais de 1 milhão de toneladas de surfactantes são produzidos a cada ano para o mercado interno só no Japão. Eles são utilizados em diversos setores como têxteis, papel, polímeros, plásticos, cosméticos, farmacêutico e alimentício, sendo um dos produtos químicos mais utilizados diariamente. O rápido desenvolvimento da indústria química que começou na década de 1960 levou ao desenvolvimento de uma ampla variedade de surfactantes químicos derivados do petróleo. Por outro lado, surfactantes naturais vem sendo produzidos a partir de matérias de origem animal ou vegetal com o aumento da consciência ambiental e ênfase em uma sociedade sustentável, em harmonia com o meio ambiente.

Mulligan (2004) investigou os avanços na aplicação dos biossurfactantes em áreas ambientais, visando aplicações sustentáveis e renováveis. Para Mulligan (2009), contaminantes orgânicos e inorgânicos podem ser tratados por biodegradação, pois os biossurfactantes reforçam a solubilização dos contaminantes.

O processo de remediação com a utilização de micro-organismos em locais contaminados (solos) se dá devido à biodegradação de hidrocarbonetos por uma população de

micro-organismos nativos no local. Este é um processo primário em que os compostos poluidores são removidos do meio ambiente e a degradação é estimulada pela adição de biossurfactantes. Essa biorremediação também é recomendável em locais contaminados por metais pesados, como urânio, chumbo e cádmio (MILLER, 1995). Para Pirôllo (2006) a dispersão e/ou solubilização de compostos orgânicos com baixa solubilidade em água é um ponto importante para a adoção da biorremediação. A capacidade dos biossurfactantes em emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água aumenta a degradação destes compostos no ambiente (NITSCHKE e PASTORE, 2002). A utilização de biossurfactantes na biodegradação aumenta a solubilidade de óleos na água, proporcionando uma maior biodisponibilidade dos substratos hidrofóbicos, levando a uma maior taxa de degradação do petróleo, quando em um derramamento no mar (WU *et al.*, 2007).

Para Cameotra e Makkar (1998), a biodegradabilidade e baixa toxicidade permite o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos, além de ser adequados para aplicações em processos de tratamento de resíduos.

3.3 - Resíduo de leveduras

Leveduras são fungos unicelulares que possuem grande capacidade de assimilar alguns substratos, com alta velocidade de crescimento em relação à fungos filamentosos e que apresentam biomassa de fácil separação em relação à bactérias. As leveduras do gênero *Saccharomyces* possuem um grande valor nutricional e industrial, tendo uma grande utilização em diversas áreas industriais, como na panificação e indústria de álcool e bebidas fermentadas, em que segundo a Food and Drug Administration (FDA) é considerado um organismo “seguro” no sentido de ter sua utilização alimentícia (SGARBIERI, 1996).

O resíduo de levedura é um subproduto da indústria cervejeira com a disponibilidade de aproximadamente 2 milhões de toneladas/ano em nosso país. Nas indústrias de cerveja do Brasil a matéria prima é composta de malte de cevada misturado a cereais ou maltose (SGARBIERI *et al.*, 2002).

O resíduo de cervejaria pode ser correspondente à massa resultante da aglutinação da casca de cereais com os resíduos do processo resultante da mistura do malte moído com a água, com o intuito de promover a hidrólise do amido a açúcares. O resíduo de cervejaria possui elevadas concentrações de proteína e carboidratos (CLARK *et al.*, 1987). Segundo

Cabral Filho (1999), o resíduo de levedura da cervejaria possui aproximadamente 32,3% de proteína bruta e 68,4% de nutrientes digestíveis totais, embora ainda exista uma variabilidade na composição, pois em experimentos, West *et al.* (1994) conseguiram 29,6% de proteína e 65,5% de nutrientes digestíveis totais. Portanto, o resíduo de cervejaria é considerado como um produto com um médio valor protéico, segundo Cabral Filho (1999).

Trabalhar com resíduo de levedura tem alguns fatores limitantes, como os baixos valores de massa seca, que giram em torno de 20 a 30 %, que pode trazer o agravante da dificuldade no transporte a longa distância (PHIPPS *et al.*, 1995). No Brasil o resíduo de levedura é comercializado de forma úmida em períodos de 20 a 30 dias. Uma solução para esse problema é a desidratação parcial do resíduo (CABRAL FILHO, 1999). Segundo a Revista Alcoobras (2001), o processo de secagem agrega valor à levedura e estima-se que as usinas secam aproximadamente 50 mil toneladas/ano, o que movimenta cerca de R\$350 milhões.

No Brasil a biomassa de levedura, em especial a originada no setor sucro-alcooleiro, é foco de muitos estudos devido a seu grande excedente, visto que o país tem uma grande produtividade de cana-de-açúcar, conseqüentemente, uma grande produção de álcool e subprodutos. Esses micro-organismos possuem uma alta velocidade de crescimento, gerando um excesso em sua produção (MOREIRA *et al.*, 2002).

Segundo a Revista Alcoobras (2001), no processo de secagem a levedura é colocada em tubulações até encontrar-se com um ar filtrado e aquecido por vapor, em que de um lado do equipamento sai a umidade da levedura na forma de vapor e do outro, o produto seco para ser embalado. O creme de levedura excedente do processo de fermentação passa por um secador (spray dryer) em forma de cone com um disco interno em rotação aproximadamente de 5000 rpm a 100°C, proporcionando a secagem.

O resíduo de levedura autolisado pode ser obtido a partir da biomassa de levedura, em que há uma ruptura das paredes celulares da biomassa de levedura lavada e seca (OLIVEIRA, 2003). Na autólise ocorre um processo de hidrólise das proteínas de levedura em que estas são hidrolisadas a aminoácidos e peptídeos. Este processo pode ser induzido com o aumento da temperatura e adição de substâncias que favoreçam a ativação de enzimas e o rompimento da parede celular (Figura 3.11), em que uma dessas substâncias são as nucleases, atuando sobre ácidos nucléicos (SGARBIERI *et al.*, 2002). Segundo Amorim e Lopes (2009), a levedura autolisada é obtida por um processo de autodigestão enzimática das proteínas e de outros componentes celulares.

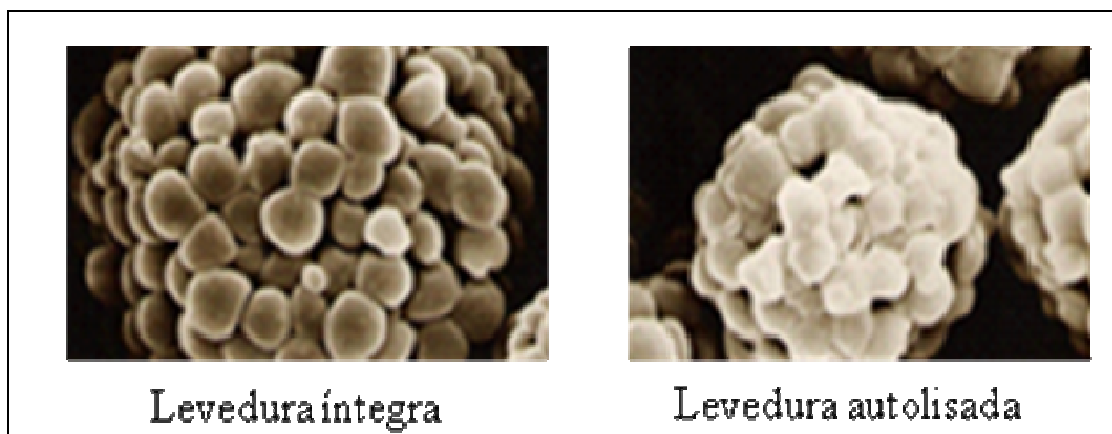


Fig. 3.11 - Levedura *Saccharomyces cerevisiae* íntegra e autolisada (MARTINS, 2009)

Segundo a Associação Européia para produtos de leveduras (<http://www.eurasyp.org/public.levure.autolyse.screen>), a levedura autolisada possui de 8 a 11% de nitrogênio total, com teor protéico de 50 a 69%, quantidade de carboidratos entre 15 a 25 % e de 3 a 10% de lipídeos

A presença de uma parede celular rígida pode ser um empecilho para a utilização da proteína de levedura para o consumo humano, segundo Oliveira (2003). A composição química da parede celular torna difícil sua digestão por enzimas humanas, fazendo com que a biodisponibilidade das proteínas seja baixa. (GÁLVEZ *et al.*, 1990). Pesquisas vêm sendo feitas com o objetivo de utilizar a levedura como uma fonte de proteínas para alimentação humana e animal, prescrito por Sgarbieri *et al.*, 2002.

Amorim e Lopes (2009) salientam que as principais diferenças entre as leveduras autolisadas e na forma íntegra são que a autolisada pode ser obtida pela autodigestão enzimática das proteínas e demais componentes.

Para Oliveira (2003) as leveduras são ricas em ácidos nucleicos, e estes estão presentes numa proporção de 8 a 25 g de ácidos nucleicos para cada 100 g de proteína.

Oliveira (2003) preparou um resíduo de levedura autolisado no setor de bioquímica do Centro de Química e Alimentos e Nutrição Aplicada, do Instituto de Tecnologia de Alimentos em Campinas-SP. Este autor lavou a biomassa de levedura e ressuspendeu em água, adicionando posteriormente alguns reagentes autolisantes e plasmolizantes. Essa mistura com pH 5,5 foi conduzida a uma dorna e mantido em fermentação a 55°C por 24 horas, com agitação mecânica e posteriormente uma desidratação em “spray dryer”.

Segundo Santos (2009) a produção mundial de leveduras de cerveja é de cerca de 80.000 ton/ano, tendo um crescimento menor que 2% ao ano enquanto o crescimento de

leveduras inativas secas de cana-de-açúcar no Brasil é de aproximadamente 4% ao ano, com produção de 75.000 ton/ano.

3.4 - Emulsões

Emulsões podem ser definidas como um sistema de dois ou mais líquidos imiscíveis, em que as gotas da fase dispersa possuem um diâmetro na ordem de 0,1 a 100 nm, sendo que a maioria das emulsões são formadas de uma fase aquosa e outra oleosa (SHAW, 1991). Para a formação de uma emulsão é necessário a adição de um agente emulsificante, também chamado tensoativo (ROSEN, 2004).

A emulsão é considerada óleo em água - O/A - quando o óleo é a fase dispersa e a água a fase contínua. Já quando tem-se a água como meio disperso e o óleo como uma fase contínua, considera-se a nomenclatura água em óleo - A/O - (KOKAL, 2002). Bobbio e Bobbio (1992) apresentam alguns tipos de emulsões que ocorrem em alimentos (Tabela 3.5).

Tab. 3.5 - Tipos de emulsões em alimentos (BOBBIO e BOBBIO, 1992)

Tipo de Alimento	Tipo de emulsão	Estabilizado por
Leite	O/A	Fosfolipídeos
Crema de leite	A/O	Fosfolipídeos, proteínas e emulsionantes sintéticos
Maionese	A/O	Proteínas, fosfolipídeos e polissacarídeos
Sorvete	O/A	Proteínas, fosfolipídeos e polissacarídeos

Segundo Djuve *et al.* (2001) para se determinar a estabilidade de uma emulsão deve-se levar em conta as propriedades interfaciais água-óleo, pois a formação da interface entre as fases dispersa e contínua aumentam a energia livre do sistema, o que termodinamicamente caracteriza as emulsões como um sistema instável.

Manning e Thompson (1995) listam alguns fatores que podem afetar a estabilidade de uma emulsão: a viscosidade da fase contínua, pois dificulta a mobilidade das gotas, o que reduz sua taxa de colisão; a rigidez do filme interfacial, em que tendo um filme interfacial rígido tem-se uma dificuldade na coalescência das gotas, promovendo uma estabilidade da emulsão; o tamanho das gotas, em que emulsões com gotas pequenas são mais estáveis do que

aquelas em que a coalescência gerou gotas de maior tamanho; a temperatura, em que a emulsão é desestabilizada com o aumento desta.

3.5 - Planejamento de experimentos

O planejamento de experimentos é necessário para se chegar à otimização de um processo, desenvolver formulações dentro de parâmetros estabelecidos e avaliar os efeitos e impactos que os fatores possuem em relação à resposta desejada. A realização dos experimentos, de forma confiável e significativa, ocorre quando da utilização de um método científico de planejamento. Durante a realização de análises experimentais etapas devem ser seguidas: a realização do planejamento e a análise estatística dos dados (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Um exemplo de planejamento de experimentos é o planejamento fatorial, que envolve todas as combinações possíveis entre todos os níveis das variáveis, permitindo assim avaliar quais variáveis interferem em uma determinada resposta, mencionando também quais destas variáveis são importantes (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Para Rodrigues e Iemma (2005) as vantagens do uso do planejamento experimental são:

- redução do tempo de experimentação, pois permite a otimização do número de experimentos;
- redução dos custos relativos à execução dos ensaios;
- permitir a avaliação e a minimização do erro experimental;
- possibilitar uma otimização multivariada;
- permitir a verificação conjunta da influência das variáveis estudadas;
- possibilidade de otimizar mais de uma resposta ao mesmo tempo.

Para Box *et al.* (1978), a metodologia do planejamento de experimentos aliada à uma análise de superfícies de resposta permite estatisticamente verificar os efeitos individuais, interações entre as variáveis, avaliação de erros experimentais e o equacionamento empírico dos resultados.

CAPÍTULO 4

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Micro-organismo

As linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas foram ATCC 9027 e ATCC 10145 oriundas da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello, em Campinas-SP.

4.2 - Fonte de carbono

A fonte de carbono para a produção do biossurfactante foi obtida a partir de efluente gorduroso, denominado flotado industrial, cedido por uma empresa frigorífica da região de Uberlândia-MG. O flotado industrial foi obtido por um processo de tratamento de flotação do efluente gorduroso com a adição de um polímero catiônico (poliacrilamida catiônica) conhecido comercialmente por FLONEX 9045, fabricado pela empresa SNF Floerger®, utilizado na concentração de 5 mg/L de efluente a receber tratamento. A amostra cedida para os estudos foi colocada em recipientes de 5 litros, os quais foram armazenados sob refrigeração a 7°C para a utilização durante todo o desenvolvimento dos experimentos evitando possíveis variações na composição do efluente.

Também foi utilizado resíduo de levedura como um nutriente, denominado, levedura cervejeira autolisada residual, com a composição de carboidratos de 15 a 25%, e teor de lipídeos de 3 a 10%.

4.3 - Caracterização da matéria-prima: efluente gorduroso

O efluente gorduroso (Figura 4.1) utilizado na produção do biossurfactante foi caracterizado por meio de análises para quantificar a concentração de nitrogênio total (item 4.3.1), e o teor percentual de gordura (item 4.3.2).



Fig. 4.1 - Amostra efluente gorduroso (Foto tirada pelo autor)

4.3.1 - Concentração de Nitrogênio Kjeldhal total

A concentração de Nitrogênio Kjeldhal total (nitrogênio orgânico e amônio) foi feita para verificar a quantidade de nitrogênio presente no efluente gorduroso utilizado nos experimentos. A concentração nitrogênio foi determinada por método titulométrico após digestão com ácido sulfúrico e catálise com sulfato de cobre e potássio, conforme disposto no APÊNDICE 1 (APHA, 1998).

4.3.2 - Determinação do teor percentual de gordura

A concentração total de gordura presente no efluente foi determinada pelo método de Bligh-Dyer. A descrição detalhada do método, apresentado por Cecchi (1999) encontra-se no ANEXO 1.

4.4 - Meios de cultura

4.4.1 - Meio de cultura para a manutenção das linhagens

As bactérias foram mantidas em tubos de ensaio com meio gelose nutriente inclinado, cuja composição é apresentada na Tabela 4.1. Quinzenalmente as linhagens eram repicadas

para um novo tubo com gelose nutriente. Após a incubação por 48 horas em estufa a $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$, os cultivos foram mantidos sob refrigeração a $7^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

A pureza dos cultivos foi periodicamente verificada pelo método de Gram, conforme Oplustil (1999).

Tab. 4.1 - Composição do meio de cultura para manutenção das linhagens

Componentes	Concentração (g/L)
Sacarose	20,0
Extrato de carne	3,0
Peptona de carne bacteriológica	5,0
Ágar bacteriológico	20,0

pH do meio ajustado em 7 utilizando NaOH 0,1N e esterilização a $121^\circ\text{C}/15\text{min}$.

4.4.2 - Meio de cultura para o preparo do inóculo

Para o crescimento das culturas bacterianas visando a obtenção do inóculo foi utilizado o meio proposto por LIMA *et al.* (2007) e SANTOS *et al.* (2002), conforme descrito na Tabela 4.2.

Tab. 4.2 - Composição do meio de cultura para crescimento do micro-organismo

Componentes	Concentração (g/L)
Glicose	10,0
Levedura cervejeira autolisada residual (LCA)	11,0
NH_4NO_3	5,7
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
Na_2HPO_4	7,0
KH_2PO_4	3,0

pH do meio ajustado em 7 utilizando NaOH 0,1N e esterilização a $121^\circ\text{C}/15\text{min}$.

4.4.3 - Meio de cultura utilizado no processo fermentativo para a produção do biossurfactante

O meio utilizado para a produção do biossurfactante foi baseado em LIMA *et al.* (2007) e SANTOS *et al.* (2002), conforme Tabela 4.3.

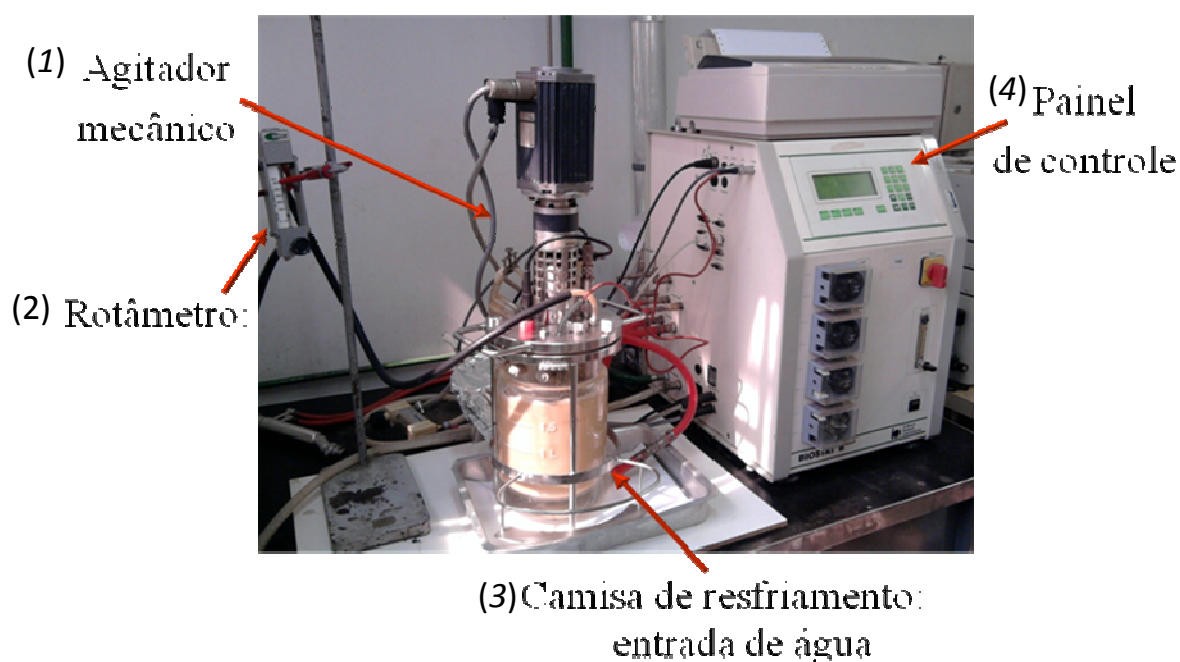
Tab. 4.3 - Composição do meio de cultura para a produção do biossurfactante

Componentes	Concentração (g/L)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
Na ₂ HPO ₄	7,0
KH ₂ PO ₄	3,0
NH ₄ NO ₃	*
Efluente gorduroso	*
Levedura cervejeira autolisada residual (LCA)	*

pH do meio ajustado em 7 utilizando NaOH 0,1N. Esterilização a 121°C/15min.

*Concentrações de levedura cervejeira autolisada residual, NH₄NO₃ e efluente gorduroso foram utilizadas com base nas concentrações requeridas em cada experimento do planejamento.

O meio de cultura (Produção) foi preparado em um reator batelada modelo *B. Braun Biotech International*, com volume total 2,0 litros e volume útil de 1,5 litros, A Figura 4.2 mostra a unidade experimental (bioreator), sendo: (1) agitador mecânico; (2) rotâmetro para controle de aeração; (3) camisa de resfriamento com entrada de água para controle da temperatura; (4) painel de controle.

Fig. 4.2 - Reator *B. Braun Biotech International* (Foto tirada pelo autor)

A realização das fermentações ocorreu após o preparo do meio de cultura (Produção) no próprio reator, com nível de aeração de 0,5 vvm e velocidade de agitação 550 rpm, estas empregadas por Lima *et al.* (2007).

4.5 - Avaliação da produção do biossurfactante

A avaliação da produção do biossurfactante ocorreu após o período fermentativo de 48 horas, com a retirada de alíquota de 30 mL, em duplicata, para centrifugação na centrífuga Beckman Coulter J-25 a 12.500 rpm (correspondente a um campo centrífugo relativo de 18.900 g) por 20 minutos, para a remoção de células. No sobrenadante realizaram-se as análises de tensão superficial, índice de emulsificação e quantidade de raminose presente.

4.6 - Experimentos

Os experimentos foram realizados com auxílio de planejamento fatorial (PF) e de planejamento composto central (PCC).

4.6.1 - Preparo do inóculo

Para ativação dos micro-organismos armazenados em tubos de ensaio foram transferidas 4 alçadas dos mesmos para 100 mL de meio de crescimento (item 4.4.2), em frasco Erlenmeyer de 500 mL a $30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 170 rpm em uma incubadora rotativa (430 RDB da marca Nova Ética) por um período de 24 horas.

O volume do meio de crescimento do micro-organismo contendo 100 mL de inóculo foi adicionado ao reator *B. Braun International* com o meio de produção do biossurfactante em um volume de 1,5 L para fermentação em 48 horas com aeração de 0,5 vvm e agitação de 550 rpm, conforme Lima *et al.* (2007), a $30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, com pH 7,0. Após este período, retirou-se amostras de 30 mL que foram centrifugadas para a separação das células (biomassa) do sobrenadante. As análises de concentração de raminose, tensão superficial e índice de emulsificação foram realizadas no sobrenadante, após a realização da fermentação.

4.6.2 - Avaliação das variáveis concentração de efluente gorduroso, nitrato de amônio e concentração de levedura cervejeira autolisada residual aplicando um planejamento experimental fatorial

Com o propósito de obter experimentos significativos e confiáveis, utilizou-se um tratamento estatístico dentro de um planejamento fatorial (PF). Adotou-se um teste de hipótese *t-Student* com área de rejeição de 5%.

Para selecionar a linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* e verificar tendências de alguma variável do processo para a produção do raminolípídeo escolheu-se fazer um PF a dois níveis com quatro variáveis (2^4), totalizando 16 experimentos. As variáveis escolhidas para avaliação no planejamento foram: concentração de efluente gorduroso; concentração de nitrato de amônio (NA); concentração de levedura cervejeira autolisada residual (LCA) e linhagem do micro-organismo.

As respostas analisadas para o planejamento efetuado foram: concentração de raminose, tensão superficial, índice de emulsificação e crescimento celular (massa seca). Os cálculos estatísticos foram realizados com auxílio do *Software Statistica 7.1*, da *StatSoft*. Neste planejamento foi estabelecido o nível superior com o sinal +1 das variáveis escolhidas para o planejamento, sendo a concentração de efluente gorduroso de 50 g/L, concentração de nitrato de amônio 7 g/L, concentração de levedura cervejeira autolisada residual 15 g/L, e linhagem de micro-organismo ATCC 10145. O nível inferior das variáveis escolhidas foi representado por -1 sendo a concentração de gordura 10 g/L, concentração de nitrato de amônio 1 g/L, concentração de levedura cervejeira autolisada residual 5g/L e linhagem de micro-organismo ATCC 9027. As concentrações adotadas nos níveis superiores e inferiores foram escolhidas conforme revisão da literatura (BANAT *et al.*, 2002; RAHMAN *et al.*, 2002; SANTA ANNA *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2002). A realização de todos os experimentos ocorreu a $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$, com pH 7,0 por um período de fermentação de 48 horas, nível de aeração 0,5 vvm, velocidade de agitação de 550 rpm e concentração de micro-organismos inicial de $1,0 \pm 0,2$ g/L de células de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e ATCC 10145. A Tabela 4.4 mostra a matriz de planejamento utilizada.

4.6.3 - Estudo cinético entre as linhagens ATCC 9027 e ATCC 10145

Visando ajustar o tempo de fermentação e verificar a reprodutibilidade dos resultados foi realizado um estudo cinético do processo fermentativo para as duas linhagem de *Pseudomonas aeruginosa*. Neste estudo foi adotado o meio de cultura de LIMA *et al.* (2007) e SANTOS *et al.* (2002), já apresentado na Tabela 4.3, sendo as concentrações de efluente gorduroso, nitrato de amônio e levedura cervejeira residual definidas conforme as melhores condições apresentadas no planejamento fatorial. As condições operacionais foram: volume útil do reator 1,5 L com aeração 0,5 vvm, velocidade de agitação de 550 rpm e temperatura de $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$, a mesma empregada por Lima *et al.* (2007). A concentração de micro-organismos inicial foi de $1,0 \pm 0,2$ g/L de células de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e ATCC 10145. Amostras de 30 mL foram retiradas para acompanhamento nos seguintes tempos: 0,

12, 24, 32, 48, 72, 96 e 120 horas, para análises das respostas: concentração de raminose; tensão superficial; índice de emulsificação; e concentração final de células.

Tab. 4.4 - Matriz do planejamento experimental fatorial 2^4

Experimento	Efluente (g/L)	NA (g/L)	LCA (g/L)	Linhagem
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

Experimentos com menor concentração adotou-se -1 e com a maior concentração +1.

Para a Linhagem, -1 representou *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e +1 a ATCC 10145.

NA – concentração de nitrato de amônio.

LCA – concentração de levedura cervejeira autolisada residual.

4.6.4 - Planejamento composto central (PCC) para as variáveis concentração de efluente gorduroso, nitrato de amônio e concentração de levedura cervejeira autolisada residual

O PCC foi utilizado para maximizar a produção do biossurfactante em relação às variáveis estudadas concentração de efluente gorduroso, concentração de nitrato de amônio (NA) e concentração de levedura cervejeira autolisada residual (LCA) pela técnica de superfície de respostas.

O Planejamento composto central foi realizado com 8 experimentos (2^3) mais 3 réplicas no ponto central e 6 experimentos no ponto axial. O α de ortogonalidade foi de 1,3533, resultando em 17 experimentos (Tabela 4.5).

Tab. 4.5 - Matriz do planejamento composto central

Experimento	Concentração de efluente (g/L)	NA (g/L)	LCA (g/L)
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	$-\alpha$	0	0
10	$+\alpha$	0	0
11	0	$-\alpha$	0
12	0	$+\alpha$	0
13	0	0	$-\alpha$
14	0	0	$+\alpha$
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

NA – concentração de nitrato de amônio.

LCA – concentração de levedura cervejeira autolisada residual.

Todos os níveis das variáveis estudadas foram adimensionalizados (codificados) pela utilização da Equação 4.1.

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\left[\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2} \right]} \quad (4.1)$$

X_n = valor codificado da variável ($n = 1, 2, \dots$)

X = valor da variável a ser calculada;

X_0 = valor da variável no ponto central;

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

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

As Equações codificadas (4.2, 4.3 e 4.4) são as equações para cada variável estudada no experimento:

$$X_1 = \frac{(\text{concentração de efluente} - 50)}{\left[\frac{70 - 30}{2} \right]} = \frac{(\text{concentração de efluente} - 50)}{[20]} \quad (4.2)$$

$$X_2 = \frac{(\text{NA} - 2,3)}{\left[\frac{4 - 0,6}{2} \right]} = \frac{(\text{NA} - 15)}{[1,7]} \quad (4.3)$$

$$X_3 = \frac{(\text{LCA} - 215)}{\left[\frac{20 - 10}{2} \right]} = \frac{(\text{LCA} - 15)}{[5]} \quad (4.4)$$

A Tabela 4.6 mostra as variáveis apresentadas na Tabela 4.5 em suas grandezas reais.

Tab. 4.6 - Matriz do planejamento composto central com valores reais para concentração de efluente, nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada

Experimento	Efluente (g/L)	NA (g/L)	LCA (g/L)
1	30	0,6	10
2	30	0,6	20
3	30	4	10
4	30	4	20
5	70	0,6	10
6	70	0,6	20
7	70	4	10
8	70	4	20
9	23	2,3	15
10	77	2,3	15
11	50	0	15
12	50	4,6	15
13	50	2,3	8,2
14	50	2,3	21,8
15	50	2,3	15
16	50	2,3	15
17	50	2,3	15

NA – concentração de nitrato de amônio (g/L).

LCA – concentração de levedura cervejeira autolisada residual (g/L).

As respostas para o planejamento realizado foram: produção de raminose, tensão superficial, índice de emulsificação e crescimento celular (massa seca).

A realização de todos os experimentos se deu a $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$, com pH 7,0 com um período de fermentação de 48 horas e com a concentração de micro-organismos inicial para a fermentação de aproximadamente $1,0 \pm 0,2$ g/L de células de *Pseudomonas aeruginosa*. A Equação 4.5 mostra a equação empírica de 2ª ordem que representa cada uma das respostas estudadas.

$$\text{Resposta} = \beta_0 + aX_1 + bX_2 + cX_3 + dX_1^2 + eX_2^2 + fX_3^2 + gX_1X_2 + hX_1X_3 + iX_2X_3 \quad (4.5)$$

Sendo:

β_0 = valor médio da resposta;

a, b, c,...i = parâmetro da equação;

X_1 = Concentração de efluente;

X_2 = Concentração de NA;

X_3 = Concentração de LCA;

Os cálculos estatísticos foram realizados com auxílio do *Software Statistica 7.1*, da *StatSoft.*, verificando quais variáveis influenciam em determinadas respostas pelos valores de *t de Student*, sendo eliminados os efeitos com nível de significância maior que 5% e a otimização foi realizada utilizando a técnica de superfície de respostas e um algoritmo implementado no *Software Maple 9.5*.

4.6.5 - Estudo cinético para avaliar melhor tempo de fermentação no reator

Um estudo cinético foi realizado com o intuito de determinar o tempo de processo. A fermentação foi realizada empregando as variáveis independentes concentrações de efluente, de nitrato de amônio e de levedura cervejeira autolisada residual no ponto de otimização das respostas obtidas no PCC do item 4.6.4.

As concentrações de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 foram as mesmas apresentados na Tabela 4.3.

O estudo cinético foi realizado no reator, modelo *B. Braun Biotech International*, apresentado na Figura 4.2 a $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$, com pH 7,0, volume útil do reator 1,5 L, aeração de 0,5 vvm e velocidade de agitação de 550 rpm, determinados por Lima *et al.* (2007), e concentração de micro-organismos inicial de $1,0 \pm 0,2$ g/L de células. Alíquotas de 30 mL

foram retiradas nos tempos 0, 6, 10, 12, 16, 24, 36, 48 e 72 horas para análise da concentração de raminose, tensão superficial, índice de emulsificação e concentração final de células. Os resultados gráficos da cinética foram obtidos com auxílio do *Software Origin Graph 8.0*.

4.7 - Procedimentos analíticos

4.7.1 - Acompanhamento da fermentação

Visando evitar a utilização de culturas contaminadas no processo, o acompanhamento da fermentação foi feito através da observação microscópica das células coradas pela técnica de coloração de Gram, disposta no ANEXO 2. Este acompanhamento também foi feito quinzenalmente nos micro-organismos armazenados nos tubos de gelose nutriente.

4.7.2 - Tensão superficial

A tensão superficial do meio de cultura foi medida para confirmar indiretamente a produção de biossurfactantes. Para tanto, amostras dos meios fermentados foram centrifugadas (30 mL) em centrífuga da marca Beckman Coulter J-25 a 12.500 rpm (correspondente a um campo centrífugo relativo de 18.900 g) a 25°C por 20 minutos para remoção das células e do sobrenadante, alíquotas de aproximadamente 10 mL dispostas em placas de Petri foram analisadas em um tensiômetro (Figura 4.3) da marca Fischer (modelo 21) previamente calibrado. O tensiômetro foi utilizado com um anel de platina-iridium de 2 cm de diâmetro e 6,0 cm de altura, o qual era imerso nas amostras contidas nas placas de Petri, para a realização da leitura, que foi feita por três vezes, e os resultados expressos como o valor médio dessas leituras.



Fig. 4.3 - Tensiômetro utilizado nas análises de tensão superficial (Foto tirada pelo autor)

4.7.3 - Concentração de raminose

A concentração de raminose foi determinada de acordo com o método descrito por Rahman *et al.*(2002) e disposto no APÊNDICE 2. Para a realização da análise de concentração de raminose foi construída previamente uma curva de calibração utilizando várias concentrações conhecidas de raminose (Figura 4.4), também apresentada no APÊNDICE 2. A realização do teste consistiu em adicionar 1 mL da amostra a 4,5 mL de ácido sulfúrico (70%) misturando vigorosamente a solução, com posterior aquecimento a 100°C por 20 minutos. Após o aquecimento, resfriou-se a solução à temperatura ambiente e adicionou 0,1 mL de ácido tioglicólico (3%), deixando-a em repouso por 3 horas sob ausência de luz. Posteriormente, fez-se a leitura da absorbância a um comprimento de onda de 420 nm utilizando um espectrofotômetro da marca Genesys - modelo 10UV.

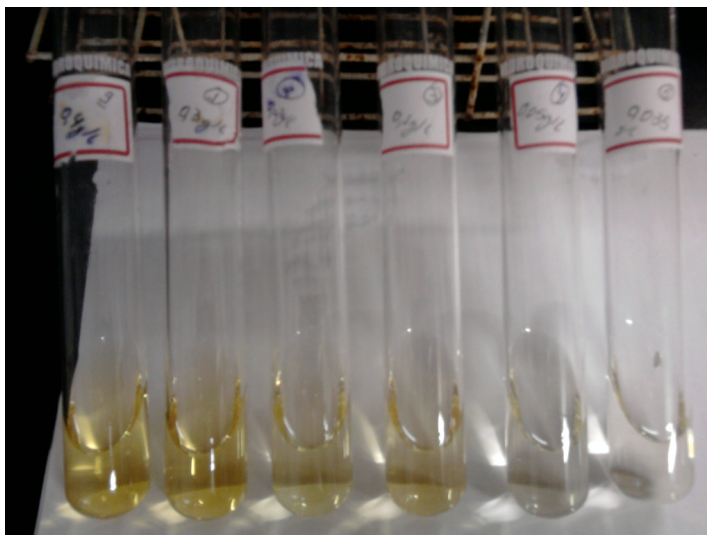


Fig. 4.4 - Amostras para curva de calibração da raminose (Foto tirada pelo autor)

4.7.4 - Índice de emulsificação

O índice de emulsificação foi determinado segundo o método descrito por Cooper e Goldenberg (1987). Para a realização deste teste uma alíquota de 6 mL de querosene de aviação foi adicionada a 4 mL de caldo fermentado centrifugado, contido em tudo de ensaio de 1,8 x 15 cm com tampa de rosca.

Com auxílio de um agitador de tubos Vortex, (marca Phoenix, modelo AP56), apresentado na Figura 4.5, a mistura era agitada vigorosamente por 2 minutos. Posteriormente, a emulsão formada foi deixada em repouso por 24 horas para que só assim fizesse a leitura do índice de emulsificação, que corresponde a um valor percentual, sendo a

altura da camada emulsionada dividida pela altura total da mistura, e multiplicado por 100 (Equação 4.6).

$$\text{Índice de emulsificação} = \frac{\text{altura da camada emulsionada}}{\text{altura total da mistura}} \times 100 \quad (4.6)$$

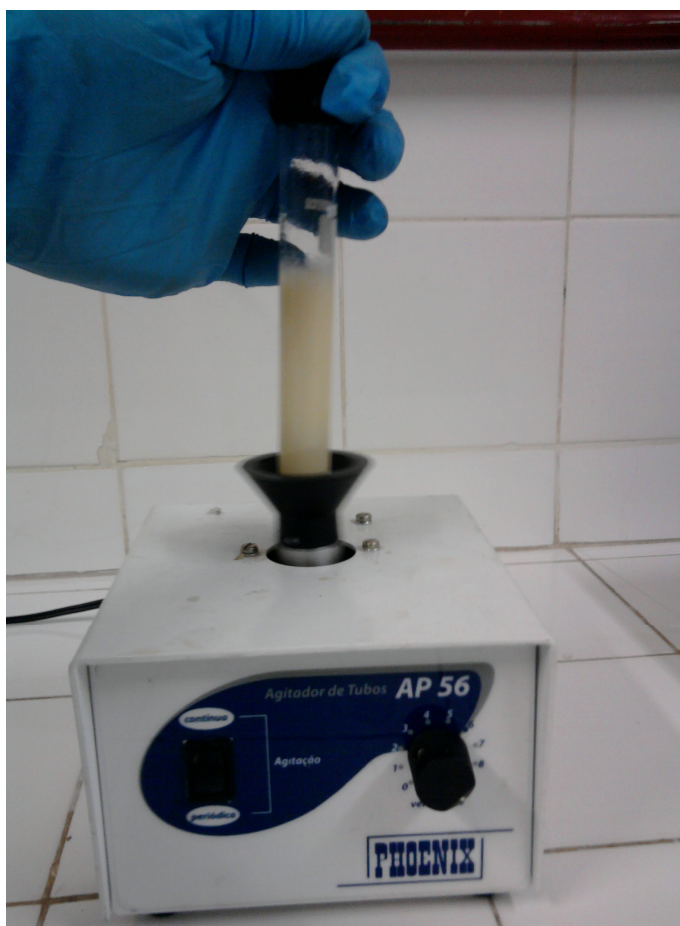


Fig. 4.5 - Agitador de tubos Vortex em análise do índice de emulsificação
(Foto tirada pelo autor)

4.7.5 - Biomassa (massa seca)

A massa seca foi determinada pela centrifugação de 30 mL do meio fermentado em centrífuga de marca Beckman Coulter J-25, com rotação de 12.500 rpm (com campo centrífugo de 18.900 g), por 20 minutos. Em seguida, as células precipitadas foram lavadas com água destiladas e centrifugadas por mais três vezes até o sobrenadante apresentar-se límpido. Após a centrifugação, as amostras foram novamente suspensas em água destilada e depois armazenadas em béqueres de 50 mL previamente guardados em um dessecador e

tarados para que fossem levados à estufa a 80°C por 48 horas. A determinação da massa seca foi feita pela diferença do peso inicial e o peso final do béquer.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Acompanhamento da fermentação

Com o método Gram foi possível observar que a espécie *Pseudomonas aeruginosa* apresenta forma de bastonetes retos, pequenos, finos e Gram-negativo.

5.2 - Caracterização do efluente gorduroso

5.2.1 - Quantidade de Nitrogênio Kjeldhal

Uma das variáveis analisadas no planejamento de experimentos foi a influência da concentração de nitrogênio e assim, inicialmente determinou-se a concentração de Nitrogênio Kjeldhal na amostra de efluente proveniente dos flotadores da estação de tratamento de efluentes de abatedouro de aves e suínos. Os resultados da análise mostraram que o efluente possui 0,2 g/L de nitrogênio, conforme determinado segundo o método disposto no APÊNDICE 1.

5.2.2 - Caracterização da matéria-prima: quantidade de gordura presente na amostra

Com relação à concentração de gordura presente neste resíduo, o método de Bligh-Dyer mostrou percentagem de gordura de $19,48 \pm 1,5 \%$.

5.3 - Planejamento fatorial a 2 níveis para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e ATCC 10145

A partir do planejamento fatorial 2^4 foi possível verificar qual das linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* empregadas proporcionou melhores resultados para a produção do biossurfactante. Assim, este planejamento foi realizado com a finalidade de selecionar a linhagem que seria usada em um segundo planejamento, o Planejamento Composto Central (PCC). A Tabela 5.1 apresenta os resultados obtidos para a produção de raminose (RM),

tensão superficial (TS), índice de emulsificação (IE) e concentração final de células (X_f). Como variáveis foram estudadas: concentração de efluente; concentração de nitrogênio utilizando nitrato de amônio (NA); e concentração de levedura cervejeira autolisada residual (LCA) e duas linhagens de *P. aeruginosa* (ATCC 9027 e 10145).

Tab. 5.1 - Matriz do planejamento experimental fatorial 2^4

Exp.	Efluente (g/L)	NA (g/L)	LCA (g/L)	Linhagem	RM (g/L)	TS (dina/cm)	IE (%)	X_f (g/L)
1	10	1	5	ATCC 9027	1,65	35,6	75,8	1,9
2	50	1	5	ATCC 9027	1,3	34,3	77,2	1,69
3	10	7	5	ATCC 9027	1,04	35,2	70,7	1,93
4	50	7	5	ATCC 9027	1,14	34,8	75,5	1,73
5	10	1	15	ATCC 9027	1,36	33,9	80,6	2,01
6	50	1	15	ATCC 9027	1,7	31,3	85,6	2,39
7	10	7	15	ATCC 9027	1,22	33,3	80,7	1,97
8	50	7	15	ATCC 9027	1,44	32,9	86,2	2,33
9	10	1	5	ATCC 10145	1,54	32,6	87,4	2,03
10	50	1	5	ATCC 10145	1,76	31,9	90,6	2,51
11	10	7	5	ATCC 10145	1,34	33,4	87,0	1,71
12	50	7	5	ATCC 10145	1,56	32,6	88,8	2,05
13	10	1	15	ATCC 10145	1,9	31,2	92,2	3,06
14	50	1	15	ATCC 10145	2,64	30,5	100,0	3,56
15	10	7	15	ATCC 10145	1,8	30,7	94,6	2,90
16	50	7	15	ATCC 10145	2,11	30,8	98,2	3,76

NA – concentração de nitrato de amônio; LCA – concentração de levedura cervejeira autolisada residual; RM – concentração de raminose; TS – tensão superficial; IE – índice de emulsificação; X_f – concentração final de células

Em todos os experimentos a concentração inicial de células manteve-se em $1,0 \pm 0,2$ g/L e a tensão superficial inicial do meio de produção em $65,6 \pm 1,2$ dina/cm.

Analisando os dados apresentados na Tabela 5.1 e considerando que neste planejamento fatorial foi considerada uma área de rejeição de 5% em um teste de hipóteses *t de Student* e relacionando as variáveis independentes com a resposta raminose, obteve-se o diagrama de Pareto (Figura 5.1).

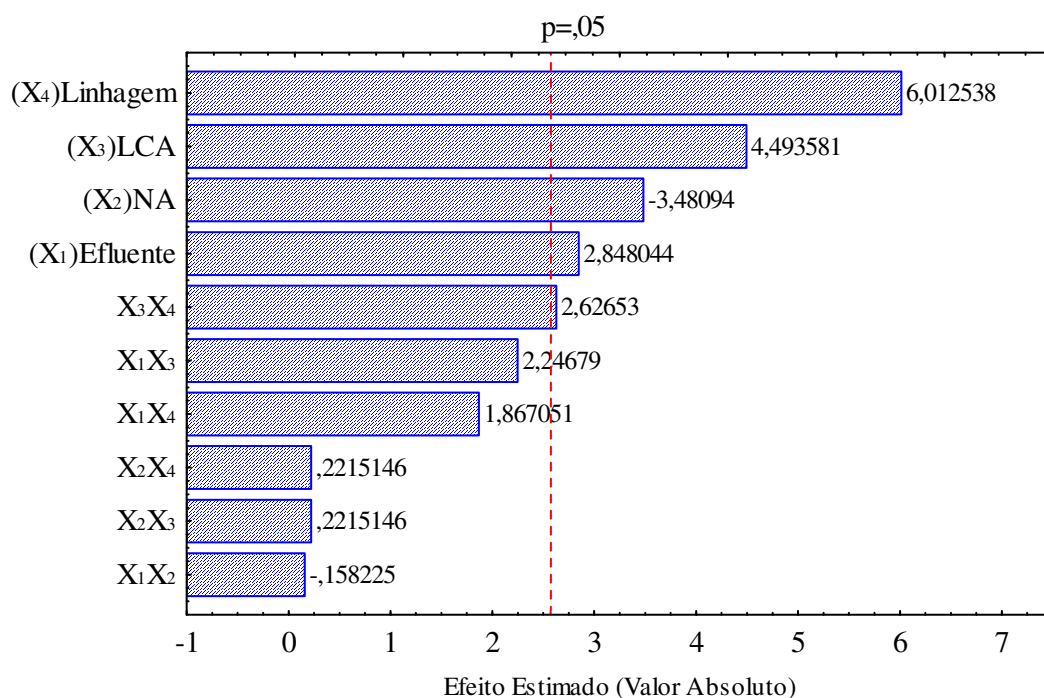


Fig. 5.1 - Diagrama de Pareto com variáveis estudadas e suas interações para resposta concentração de raminose

A Figura 5.1 mostra que as variáveis que influenciaram na produção de raminose foram a linhagem (X₄), a concentração de levedura cervejeira autolisada residual (X₃ - LCA), concentração de nitrato de amônio (X₂ - NA), a concentração de efluente (X₁) e a interação entre a levedura cervejeira autolisada residual e a linhagem (X₃X₄). A linhagem foi a variável que mais influenciou na obtenção de raminose. O sinal de positivo para X₄ significa que quando esta variável passa do nível -1 (ATCC 9027) para o nível +1 (ATCC 10145) a resposta concentração de raminose é aumentada.

A equação do modelo empírico ajustada para a concentração de raminose em função das variáveis significativas é apresentada na Equação 5.1:

$$\text{Raminose} = 1,593750 + 0,112500 X_1 - 0,137500 X_2 + 0,177500 X_3 + 0,237500 X_4 + 0,088750 X_1X_3 + 0,073750 X_1X_4 + 0,103750 X_3X_4 \quad (5.1)$$

A Equação 5.1 têm o valor do coeficiente de determinação (R²) de 0,95, indicando que cerca de 95 % dos dados experimentais ajustaram-se ao modelo.

A linhagem utilizada trata-se de uma variável qualitativa, e na construção do modelo empírico só são levadas em consideração as variáveis quantitativas. Assim, tornou-se necessário uma correção da Equação ajustada 5.1, substituindo a variável linhagem (X₄) por

-1 ou +1, maximizando as respostas de concentração de raminose, índice de emulsificação e concentração final de células e minimizando a tensão superficial. Essa correção foi feita também para as demais equações para cada resposta estudada. Dessa forma, a equação do modelo empírico ajustada para a concentração de raminose em função das variáveis significativas, com a substituição de X_4 por +1, é descrita conforme a Equação 5.2:

$$\text{Raminose} = 1,83125 + 0,18625X_1 - 0,137500X_2 + 0,28125X_3 + 0,088750 X_1X_3 \quad (5.2)$$

A opção de substituição da linhagem por +1 na Equação 5.1 maximizou a produção de raminose. Por comparação, com a Equação 5.3 a variável X_4 foi substituída por -1, mostrando que era obtido menores concentrações de raminose.

$$\text{Raminose} = 1,35625 + 0,03875X_1 - 0,137500X_2 + 0,07375X_3 + 0,088750X_1X_3 \quad (5.3)$$

Nas Equações 5.2 e 5.3, o valor negativo do coeficiente de regressão para X_2 mostra que menores concentrações de nitrato de amônio promovem maior produção de raminose, o que pode ser observado comparando os experimentos 1 e 3; 2 e 4; 5 e 7; 6 e 8; 9 e 11; 10 e 12; 13 e 15; 14 e 16. O sinal de positivo para X_1 e X_3 indica que quanto maior a concentração de efluente e de LCA maior produção de raminose, conforme comparação entre os experimentos: 1 e 6; 3 e 8; 9 e 14; 11 e 16.

Rodrigues *et al.* (2006) estudaram produção de biossurfactante produzido por linhagens de *Lactobacillus*, e mostraram que para a linhagem *Lactobacillus pentosus* CECT-4023, a produção iniciava nas primeiras 4 horas de fermentação, obtendo a concentração final de 1,4 g de biossurfactante/L, em um tempo total de fermentação de 72 horas. Esta concentração de biossurfactante provavelmente foi inferior à maioria das concentrações obtidas na Tabela 5.1, pois o biossurfactante raminolipídeo apresenta uma ou duas moléculas de raminose na sua composição e alguns autores (BENINCASA e ACCORSINI, 2008; SOLANAS *et al.*, 2004) sugerem fatores maiores que 3 na relação entre a concentração de raminose e a de raminolipídeo.

A Figura 5.2 mostra a distribuição dos resíduos. Percebe-se que a distribuição dos resíduos foi aleatória em torno de zero, sem nenhuma tendência. A Figura 5.3 mostra os valores preditos em função dos observados, e mostra que os valores observados ficaram próximos dos preditos.

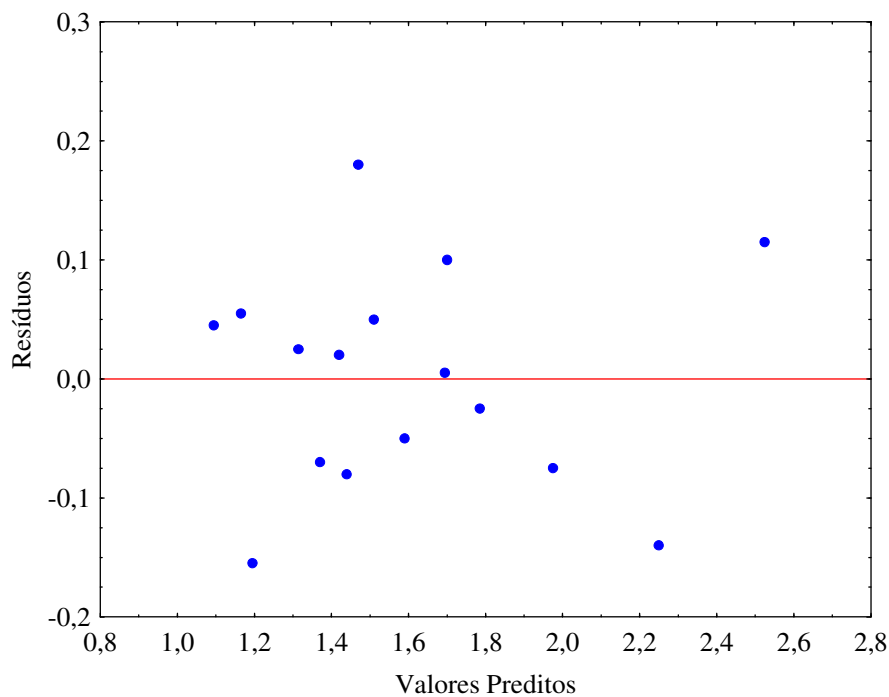


Fig. 5.2 - Distribuição dos resíduos relativo à concentração de raminose

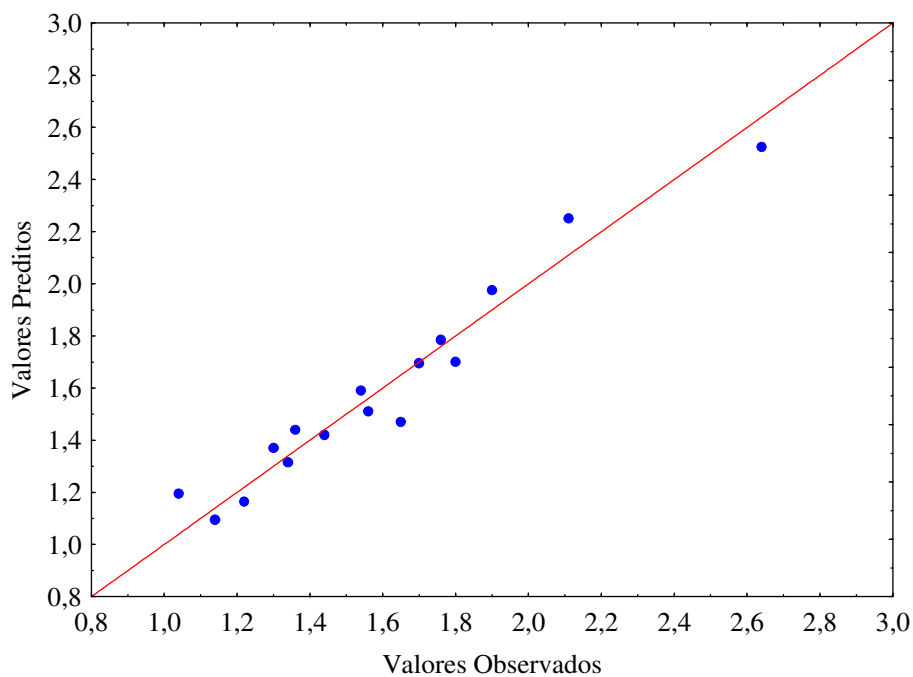


Fig. 5.3 - Valores preditos em função dos observados relativos à concentração de raminose

Em relação à tensão superficial, pode-se dizer que a variável mais significativa neste resultado foi a linhagem do micro-organismo (X_4), seguido pela levedura cervejeira autolisada residual (X_3 - LCA) e a concentração de efluente (X_1), conforme mostra a Figura 5.4.

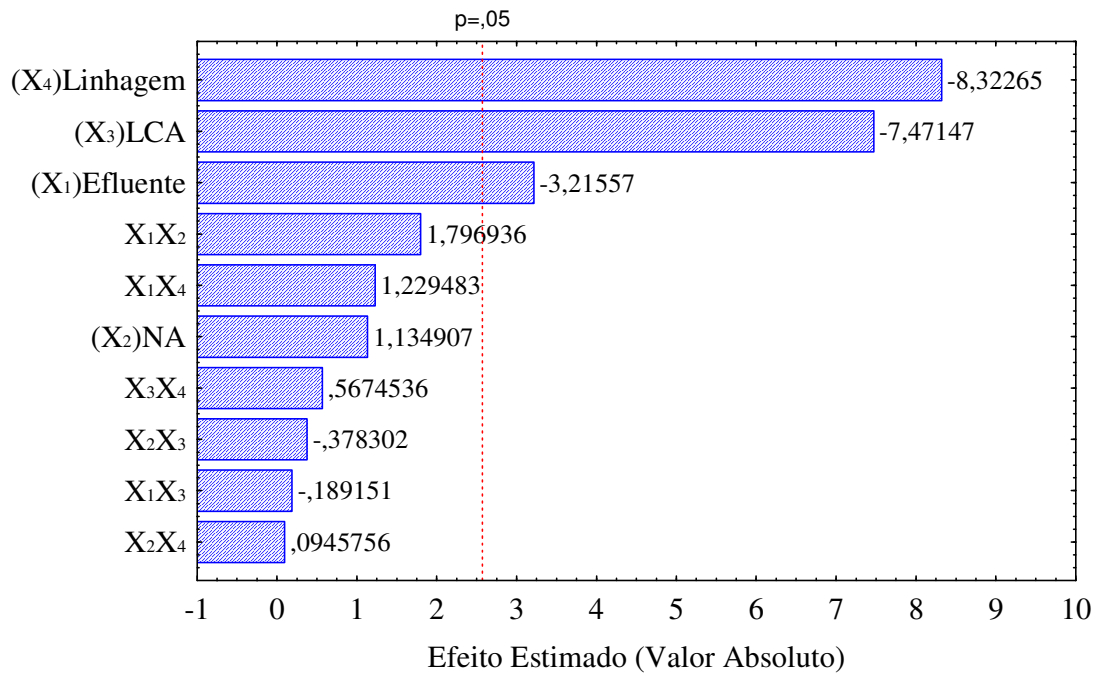


Fig. 5.4 - Diagrama de Pareto com variáveis estudadas e suas interações para tensão superficial

Na Figura 5.4, o sinal negativo para o efeito estimado de X_4 significa que quando esta variável passa do nível -1 (ATCC 9027) para o nível +1 (ATCC 10145) a tensão superficial é diminuída.

A equação ajustada para a tensão superficial em relação às variáveis significativas concentração de efluente (X_1), LCA (X_3) e Linhagem (X_4) é apresentada pela Equação 5.4:

$$\text{Tensão superficial} = 32,81250 - 0,42500 X_1 - 0,98750 X_3 - 1,10000 X_4 \quad (5.4)$$

A Equação 5.4 tem coeficiente de determinação (R^2) de 0,92, indicando que cerca de 92% dos dados experimentais se ajustam ao modelo proposto.

Substituindo X_4 por +1 na Equação 5.4, a equação ajustada para a tensão superficial em relação às variáveis significativas concentração de efluente (X_1) e LCA (X_3) passa a ser descrita conforme a Equação 5.5

$$\text{Tensão superficial} = 31,7125 - 0,42500 X_1 - 0,98750 X_3 \quad (5.5)$$

Caso fosse adotado a substituição da variável por X_4 por -1 na Equação 5.4, a tensão superficial será maior, conforme a Equação 5.6.

$$\text{Tensão superficial} = 33,9125 - 0,42500 X_1 - 0,98750 X_3 \quad (5.6)$$

Os sinais negativos de X_1 e X_3 nas Equações 5.5 e 5.6 mostram que maiores concentrações de efluente e LCA promovem a redução da tensão superficial, sendo mais indicado para produção do biossurfactante, o que pode ser comprovado comparando os resultados obtidos para a tensão superficial nos experimentos: 1 e 6; 3 e 8; 9 e 14; 11 e 16.

A Figura 5.5 mostra a distribuição dos resíduos em torno de zero, sendo aleatória e sem nenhuma tendência. A Figura 5.6 mostra os valores preditos ficaram próximos dos observados para a tensão superficial.

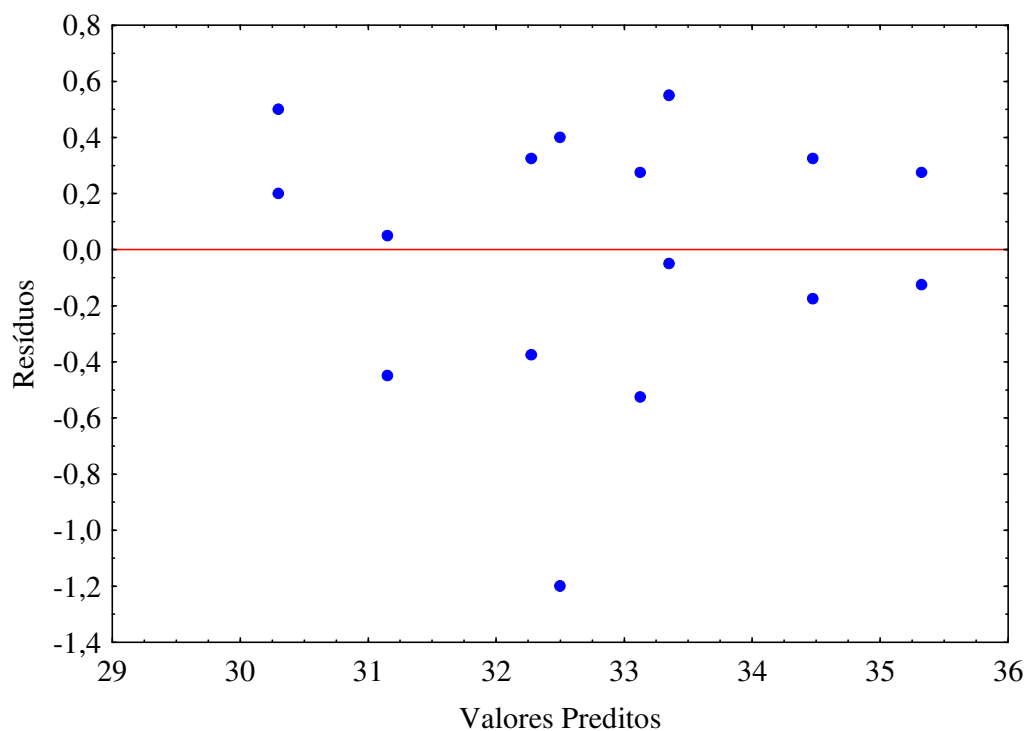


Fig. 5.5 - Distribuição dos resíduos relativo à tensão superficial

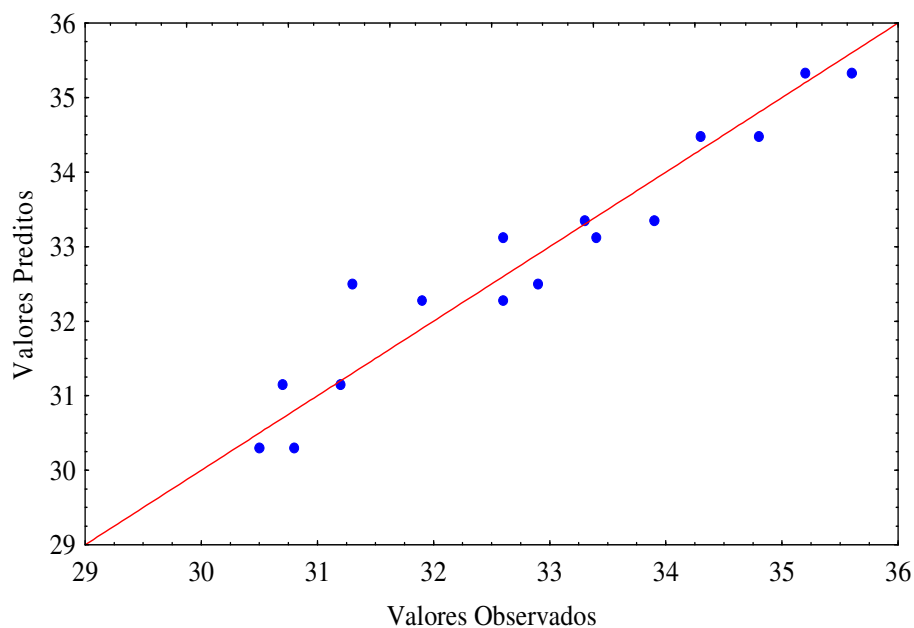


Fig. 5.6 - Valores preditos em função dos observados relativos à tensão superficial

Na Figura 5.7 observa-se para a resposta índice de emulsificação que foram significativas as seguintes variáveis: linhagem do micro-organismo (X_4), que apresentou maior influência, seguido pela concentração de LCA (X_3) e concentração de efluente (X_1). O sinal positivo para X_4 significa que quando esta variável passa do nível -1 (ATCC 9027) para o nível +1 (ATCC 10145) a emulsificação é aumentada.

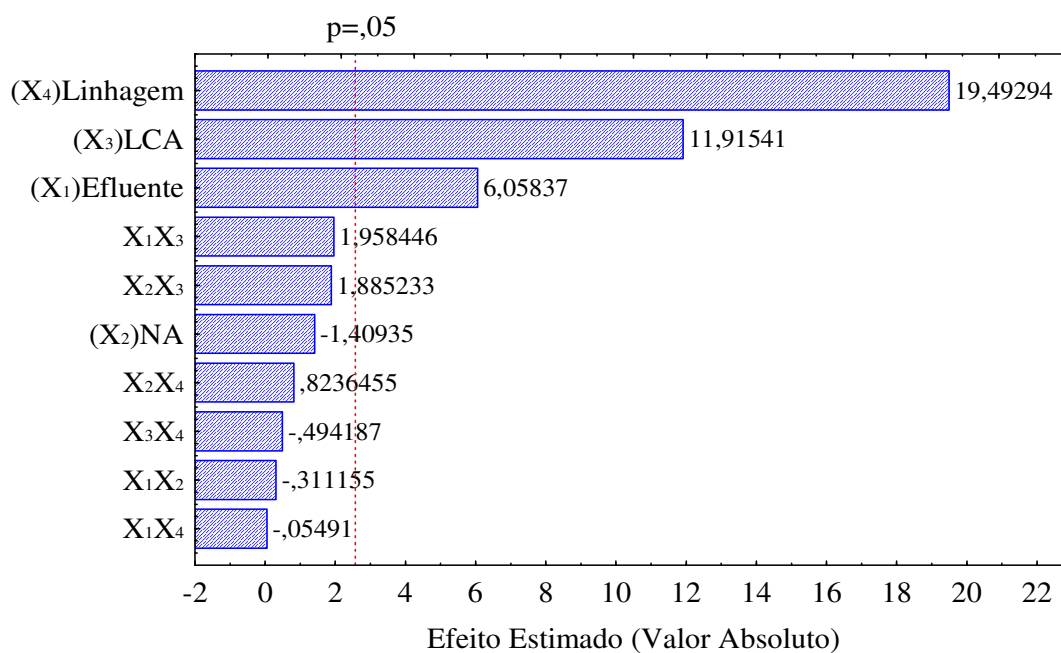


Fig. 5.7 - Diagrama de Pareto com variáveis estudadas para o índice de emulsificação

A equação ajustada para o índice de emulsificação (Equação 5.7) é dada por:

$$\text{Índice de Emulsificação} = 85,69375 + 2,06875X_1 + 4,06875 X_3 + 6,65625 X_4 \quad (5.7)$$

O coeficiente de determinação (R^2) para a Equação 5.7 foi de 0,97, indicando que cerca de 97% dos dados experimentais se ajustam no modelo proposto

Com a substituição de X_4 por +1 na Equação 5.7 tem-se a Equação 5.8

$$\text{Índice de Emulsificação} = 92,35 + 2,06875X_1 + 4,06875 X_3 \quad (5.8)$$

Caso fosse adotado a variável linhagem com -1, obter-se-ia uma equação ajustada que forneceria um menor índice de emulsificação, quando substituído na Equação 5.7 (Equação 5.9).

$$\text{Índice de Emulsificação} = 79,0375 + 2,06875X_1 + 4,06875 X_3 \quad (5.9)$$

. Os sinais positivos de X_1 e X_3 nas Equações 5.8 e 5.9 mostram que maiores concentrações de efluente e LCA proporcionaram maior índice de emulsificação. Este resultado está de acordo com os observados nos experimentos: 1 e 6; 3 e 8; 9 e 14; 11 e 16.

Percebe-se pela distribuição dos resíduos apresentados na Figura 5.8 uma distribuição em torno de zero e aleatória sem nenhuma tendência. A Figura 5.9 mostra os valores preditos em função dos observados. Verifica-se que os valores observados ficaram próximos dos preditos.

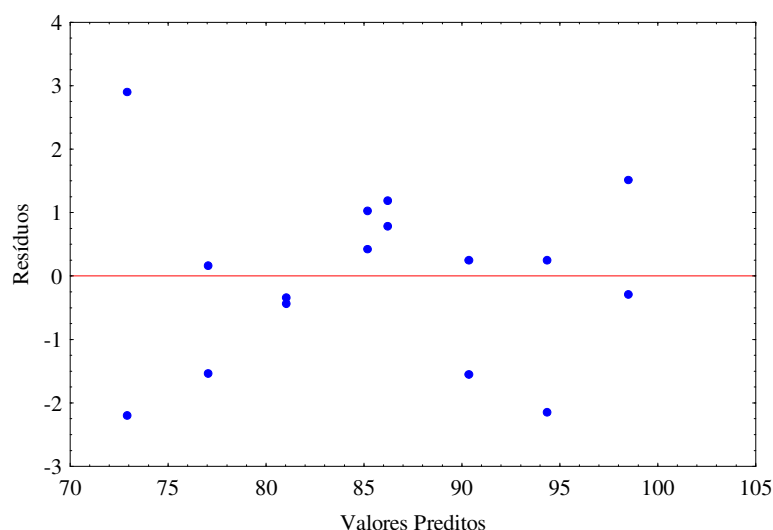


Fig. 5.8 - Distribuição dos resíduos relativo ao índice de emulsificação

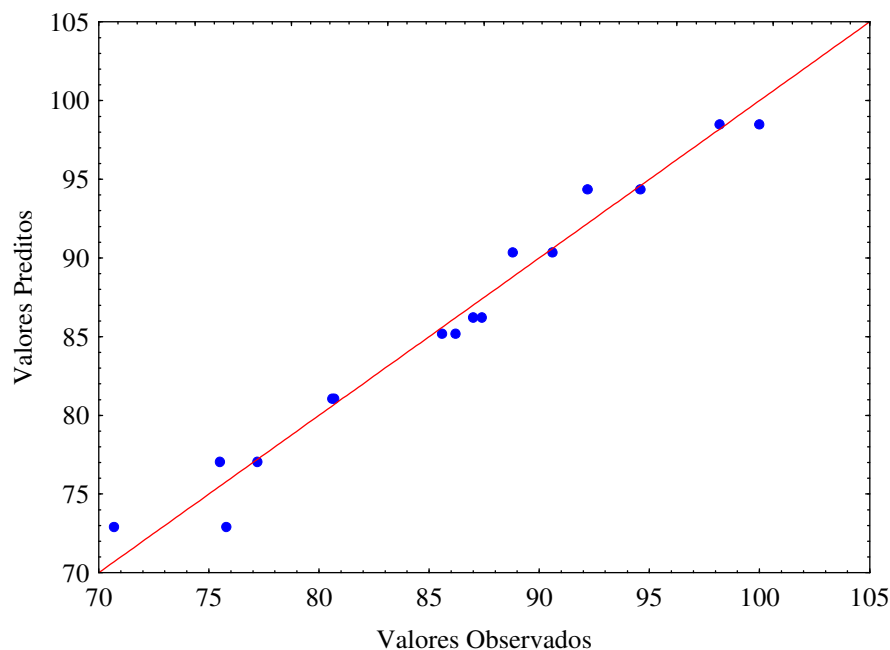


Fig. 5.9 - Valores preditos em função dos observados relativos ao índice de emulsificação

Para o crescimento celular, ou seja, a concentração final de células (X_f) verifica-se que as variáveis LCA (X_3), linhagem (X_4), interação entre o LCA e a linhagem (X_3X_4), efluente (X_1) e interações X_1X_4 e X_1X_3 são significativas, sendo que a concentração de LCA é a variável mais significativa, conforme Figura 5.10. Este resultado já era esperado, pois os nutrientes presentes na levedura cervejeira residual colaboram para o crescimento dos micro-organismos.

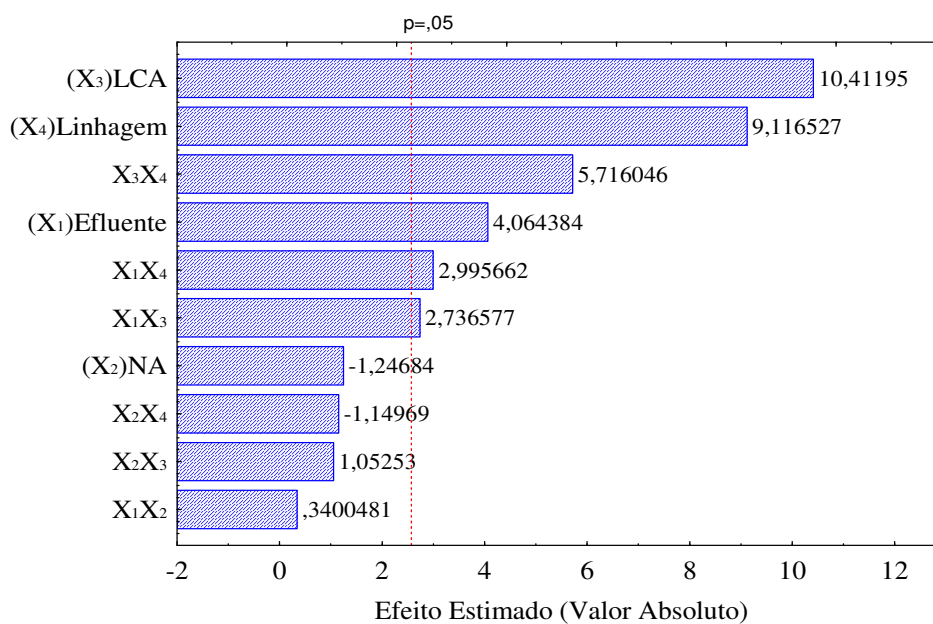


Fig. 5.10 - Diagrama de Pareto com variáveis estudadas para resposta concentração final de células

Na Figura 5.10, o sinal de positivo para X_4 significa que a linhagem *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145 cresceu mais do que a linhagem ATCC 9027. Quando esta variável passa do nível -1 (ATCC 9027) para o nível +1 (ATCC 10145) a concentração final de células é aumentada.

A Equação 5.10 representa a resposta ajustada para o crescimento celular, em relação às variáveis significativas:

$$\text{Concentração final de células} = 2,345625 + 0,156875X_1 + 0,401875 X_3 + 0,351875 X_4 + 0,105625 X_1X_3 + 0,115625 X_1X_4 + 0,220625 X_3X_4 \quad (5.10)$$

A Equação 5.10 apresenta coeficiente de determinação (R^2) de 0,97, em que 97% dos dados experimentais se ajustam ao modelo.

Substituindo X_4 por +1 na Equação 5.10 tem-se a Equação 5.11 ajustada para o crescimento celular, em relação à concentração de efluente (X_1) e levedura cervejeira autolisada residual (X_3).

$$\text{Concentração final de células} = 2,6975 + 0,2725X_1 + 0,6225 X_3 + 0,105625 X_1X_3 \quad (5.11)$$

Caso fosse adotado a variável como X_4 como -1 em substituição na Equação 5.10, a concentração final de células seria menor, conforme apresentado na Equação 5.12:

$$\text{Concentração final de células} = 1,99375 + 0,04125X_1 + 0,18125 X_3 + 0,105625 X_1X_3 \quad (5.12)$$

Os coeficientes de X_1 e X_3 positivos nas Equação 5.11 e 5.12, e nos efeitos estimados apresentados na Figura 5.10 significam que obtêm-se maior concentração de células para maiores concentrações de efluente e LCA, conforme comparação dos experimentos 1 e 6; 3 e 8; 9 e 14; 11 e 16.

Como o aumento no crescimento celular não é uma resposta de interesse, pois significa maior produção de biomassa residual no processo fermentativo, esta resposta foi analisada no sentido de obter maior concentração final de micro-organismo, pois foi verificado que nas condições de processo em que utilizou-se a linhagem com maior crescimento celular obteve-se melhores resultados de concentração de raminose, tensão superficial e índice de emulsificação.

A Figura 5.11 mostra que a distribuição dos resíduos foi aleatória em torno de zero, sem nenhuma tendência. A Figura 5.12 apresenta os valores preditos em função dos observados, mostrando que os valores observados ficaram próximos dos preditos, com uma tendência constante e distribuição normal dos mesmos.

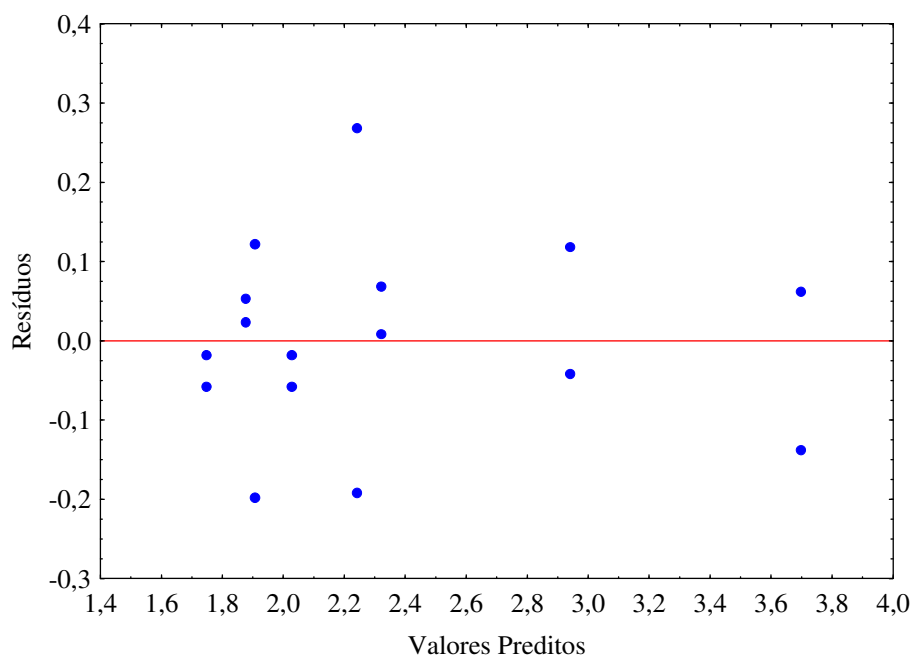


Fig. 5.11 - Distribuição dos resíduos relativo à concentração final de células

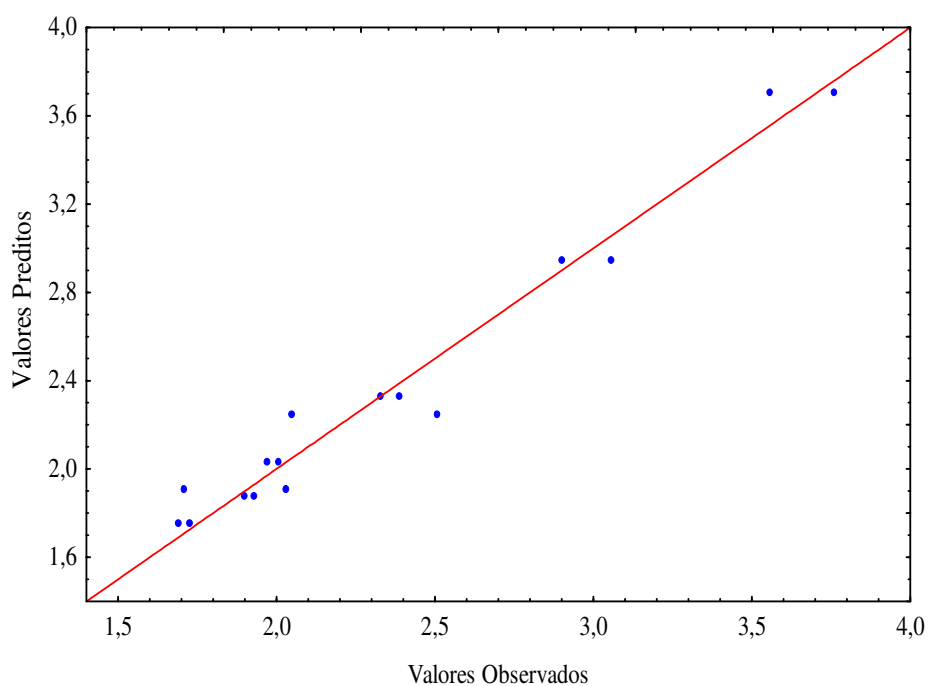


Fig. 5.12 - Valores preditos em função dos observados relativos à concentração final de células

Conforme os diagramas de Pareto apresentados anteriormente (Figuras. 5.1, 5.4, 5.7, e 5.10), a variável linhagem de micro-organismo foi a que proporcionou maior significância na obtenção das respostas estudadas, ficando esta em segundo lugar somente para a resposta concentração celular. Para esta resposta a concentração de LCA mostrou-se mais significativa.

De acordo com a Tabela 5.1, os experimentos 6 e 14 foram os que apresentaram melhores resultados em relação ao conjunto de maior produção de raminose e quantidade de índice de emulsificação, crescimento celular e baixa tensão superficial para as linhagens 9027 e 10145, respectivamente. Verifica-se que nestes experimentos foram empregadas menores concentração de nitrato de amônio e maiores concentrações de efluente e LCA. Comparando estes resultados pode-se concluir que a linhagem *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 apresentou melhores resultados do que a linhagem ATCC 9027, pois com as mesmas condições das variáveis a ATCC 10145 conseguiu produzir 0,94 g/L a mais de raminose, reduziu de 0,8 dina/cm a tensão superficial do meio em relação ao resultado obtido pela ATCC 9027, além de conseguir emulsionar 100% de querosene.

Os resultados obtidos no planejamento fatorial sugerem que a linhagem ATCC 10145 apresentou melhor potencial de produção do biossurfactante, pois na realização de todos os experimentos os melhores resultados (maior concentração de raminose, menor tensão superficial, maior concentração final de células e maior emulsificação) foram obtidos quando utilizou-se o nível +1 para a linhagem (X_4). Sendo assim, a linhagem ATCC 10145 foi a escolhida para continuar a realização de novos experimentos.

5.4 - Análise Cinética para as linhagens ATCC 9027 e ATCC 10145

A Figura 5.13 apresenta o estudo cinético em que a linhagem ATCC 10145 apresentou melhores resultados em relação à linhagem ATCC 9027 para as respostas concentração de raminose, tensão superficial, índice de emulsificação e crescimento celular (Massa seca), conforme Figura 5.13. Assim esta linhagem foi utilizada no delineamento composto central.

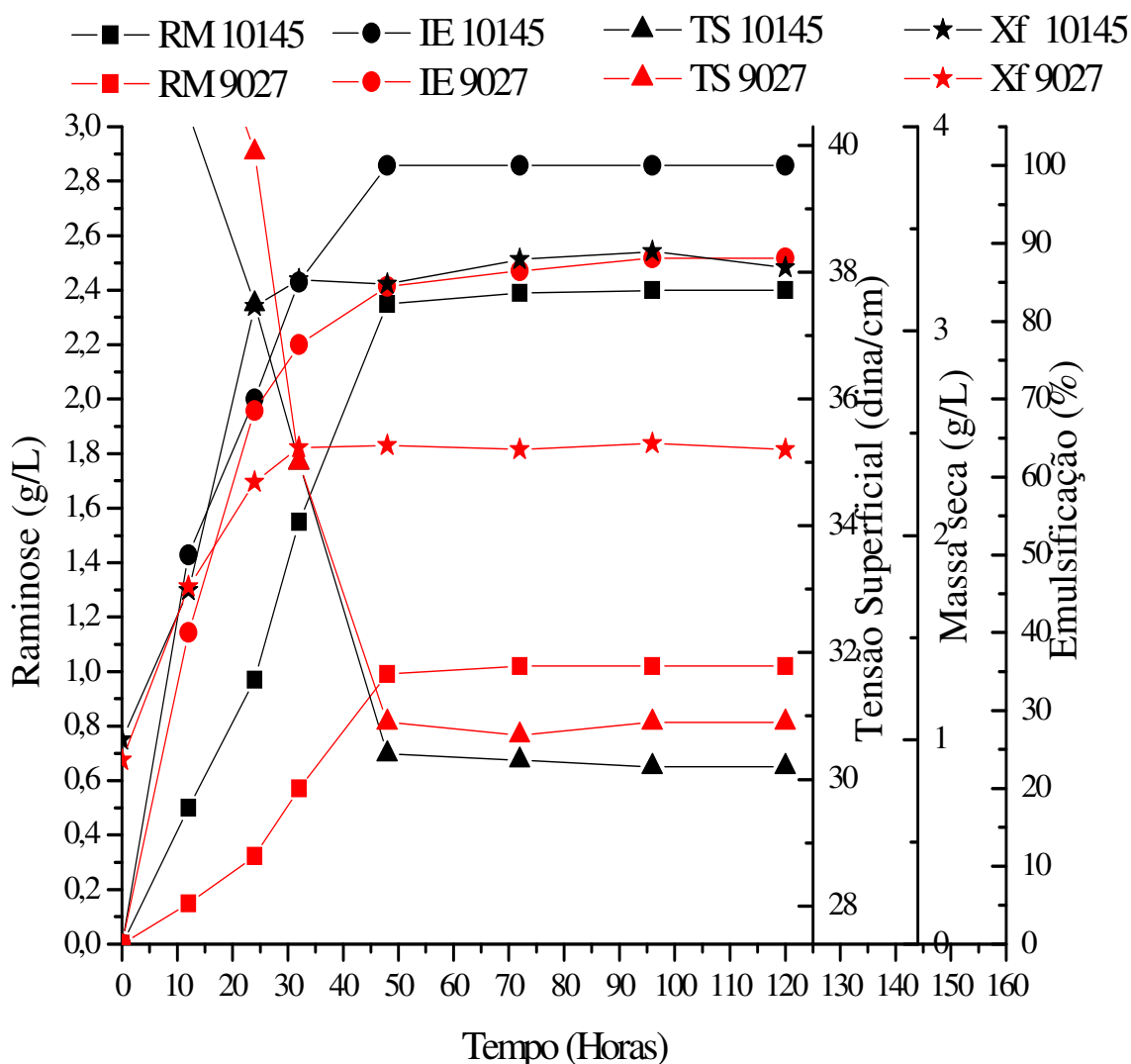


Fig. 5.13 - Evolução ao longo do tempo para concentrações ramnose (RM), tensão superficial (TS), índice de emulsificação (IE) e concentração final de células (X_f) em fermentação por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e ATCC 10145 em reator batelada com taxa de aeração 0,5 vvm, velocidade de agitação de 550 rpm, temperatura de $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e volume útil de 1,5 L. Meio de cultura composto por: 50 g/L de efluente gorduroso; 1 g/L de NH_4NO_3 ; 15 g/L de levedura cervejeira autolisada residual; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 7,0 g/L de Na_2HPO_4 ; 3,0 g/L de KH_2PO_4 .

Os resultados apresentados na Figura 5.13, obtida com auxílio do *Software Origin Graph 8.0*, mostram que para as duas linhagens estudadas, após 48 horas de fermentação, a concentração de ramnose, a tensão superficial e o índice de emulsificação aumentaram muito pouco ou mantiveram-se constantes. Nota-se também que o crescimento das células para as duas linhagens (ATCC9027 e ATCC10145) ocorreu nas primeiras 24 horas, mostrando que a produção de biossurfactante foi parcialmente associado ao crescimento, assim como relatado

por Noghabi *et al.* (2010), e em que a melhor produção do biossurfactante do raminolípídeo a partir de *Pseudomonas aeruginosa* MR01 só ocorre em 48 horas. Porém o crescimento celular atingiu a fase estacionário antes deste período, e mesmo assim a produção de raminolípídeo continuou até as 48 horas.

Como os valores da concentração de raminose, crescimento celular e índice de emulsificação para a *P. aeruginosa* ATCC 10145 foram superiores aos da *P. aeruginosa* ATCC 9027, adotou-se esta linhagem para o próximo planejamento experimental e também o tempo de 48 horas de fermentação. O próximo planejamento (PCC) teve como finalidade a determinação das melhores condições operacionais em relação às variáveis anteriormente estudadas. Este planejamento foi realizado utilizando informações dos resultados obtidos no planejamento fatorial realizado, com as seguintes faixas para a concentração de efluente, de NA e de LCA, respectivamente, 23 a 77 g/L, 0 a 4,6 g/L e de 8,2 a 21,8 g/L.

O tempo de 48 horas para a produção de biossurfactante também foi adotado por Fernandes *et al.* (2005), que produziu raminolípídeo utilizando a linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* LBI e como substrato resíduos da fabricação do óleo de girassol. Nesse estudo no melhor tempo de fermentação, obteve-se 12,1 g/L de raminolípídeos.

5.5 - Planejamento Composto Central (PCC) para as variáveis concentração de efluente, nitrato de amônio e concentração de levedura cervejeira autolisada residual

O Planejamento Composto Central (PCC) obtido para as variáveis: concentração de efluente, concentração de nitrato de amônio (NA) e concentração de levedura cervejeira autolisada residual (LCA) está disposto na Tabela 5.2, com os resultados obtidos para a produção de raminose (RM), tensão superficial (TS), índice de emulsificação (IE) e concentração de célula final (X_f) em massa seca. Todos os experimentos foram feitos em duplicata em um reator modelo *B. Braun Biotech International* (Figura 4.2) e os resultados apresentados são a média dos valores obtidos. Todos os experimentos foram realizados a $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$, com pH 7,0, aeração 0,5 vvm e agitação de 550 rpm. As condições de nível de aeração e velocidade de agitação foram selecionadas de acordo de acordo com Lima *et al.* (2007).

Neste planejamento composto central em todos os experimentos a concentração inicial de células manteve-se em $1,0 \pm 0,2$ g/L e a tensão superficial do meio de produção em torno de $65,6 \pm 1,2$ dina/cm.

Tabela 5.2 - Resultados do planejamento composto central em relação à concentração de efluente, concentração de nitrato de amônio e concentração de levedura cervejeira autolisada residual

Exp.	Efluente (g/L)	NA (g/L)	LCA (g/L)	RM (g/L)	TS (dina/cm)	IE (%)	X _f (g/L)
1	30	0,6	10	1,80	30,7	77,81	2,49
2	30	0,6	20	2,01	29,9	100,00	3,56
3	30	4	10	1,53	31,0	76,62	2,19
4	30	4	20	2,36	30,8	100,00	2,36
5	70	0,6	10	3,04	29,1	100,00	1,35
6	70	0,6	20	3,50	28,1	100,00	1,94
7	70	4	10	1,99	30,2	95,24	2,45
8	70	4	20	2,79	29,5	95,60	2,74
9	23	2,3	15	1,81	30,6	92,24	2,66
10	77	2,3	15	3,22	27,1	100,00	2,20
11	50	0	15	3,16	27,7	100,00	2,63
12	50	4,6	15	2,71	29,0	92,86	2,46
13	50	2,3	8,2	2,30	28,9	90,43	3,11
14	50	2,3	21,8	2,71	29,4	100,00	3,79
15	50	2,3	15	3,34	27,3	100,00	3,68
16	50	2,3	15	3,37	27,2	100,00	3,67
17	50	2,3	15	3,39	27,3	100,00	3,67

NA – concentração de nitrato de amônio; LCA – concentração de levedura cervejeira autolisada residual; RM – concentração de raminose; TS – tensão superficial; IE – índice de emulsificação; X_f – concentração final de células;

5.5.1 - Análise do PCC para a resposta concentração de raminose

Analizando os dados apresentados no Planejamento Composto Central (Tabela 5.2), adotando neste planejamento uma área de rejeição de 5% em um teste de hipóteses *t de Student* e relacionando as variáveis independentes com a resposta raminose, obteve-se o diagrama de Pareto (Figura 5.14), apenas com as variáveis significativas:

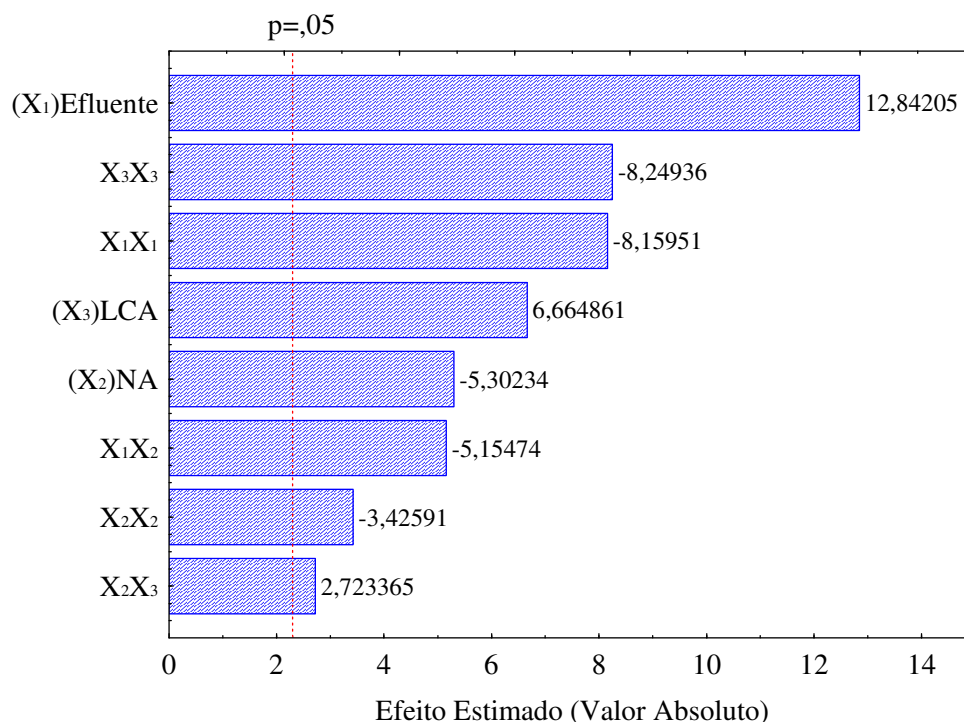


Fig. 5.14 - Diagrama de Pareto com variáveis estudadas e suas interações para resposta concentração de raminose

Percebe-se que a variável isolada que mais influenciou na produção de raminose foi a concentração de efluente (X₁), seguido por LCA (X₃) e NA (X₂).

A equação do modelo empírico ajustada para a concentração de raminose em função das variáveis significativas apresentadas no Diagrama de Pareto (Figura 5.14) é descrita pela Equação 5.13:

$$\begin{aligned} \text{Raminose} = & 3,309900 + 0,473555X_1 - 0,195526X_2 + 0,245769X_3 - 0,396820X_1X_1 \\ & - 0,166611X_2X_2 - 0,401189X_3X_3 - 0,229500X_1X_2 + 0,121250X_2X_3 \end{aligned} \quad (5.13)$$

A Equação 5.13 apresentou o valor do coeficiente de determinação (R²) de 0,98, indicando que cerca de 98% dos dados experimentais ajustam ao modelo.

Os valores positivos para X₁ e X₃ indicam que quanto maior a concentração de efluente e de LCA obtêm-se uma maior produção de raminose, conforme comparação entre os experimentos: 1 e 6; 3 e 8; 9 e 14, apresentados na Tabela 5.2. O valor negativo para X₂ indica que menores concentrações de nitrato de amônio conduzem a maiores concentrações de raminose, conforme comparação entre os experimentos: 1 e 3; 5 e 7; 11 e 12. Em relação a maior concentração de substrato (efluente), proporcionar maior produção de raminose, esta já foi relatada por Lima *et al.* (2007), em que utilizando como substrato óleo de soja residual

obteve-se até 2,3 g/L de raminose em um período de 48 horas. Lang e Wullbrandt (1999) também relataram a importância de se trabalhar com elevadas concentrações de fonte de carbono para maiores produções de biossurfactante. Estes autores, em fermentação com *Pseudomonas* sp., obtiveram concentração de até 5,4 g/L de raminolipídeo em 150 horas de fermentação, sendo a quantidade de fonte de carbono na ordem de 10% (p/v) de resíduo de óleo de milho.

Em relação às comparações feitas entre a concentração de raminolipídeos e a concentração de raminose, Benincasa e Accorsini (2008) e Solanas *et al.* (2004) utilizam a relação de que a concentração de raminolipídeo é aproximadamente 3 vezes a de raminose.

A Figura 5.15 mostra a distribuição dos resíduos em torno de zero. A distribuição dos resíduos foi aleatória em torno de zero, sem nenhuma tendência. A Figura 5.16 mostra os valores preditos em função dos observados, em que os valores observados ficaram próximos dos preditos.

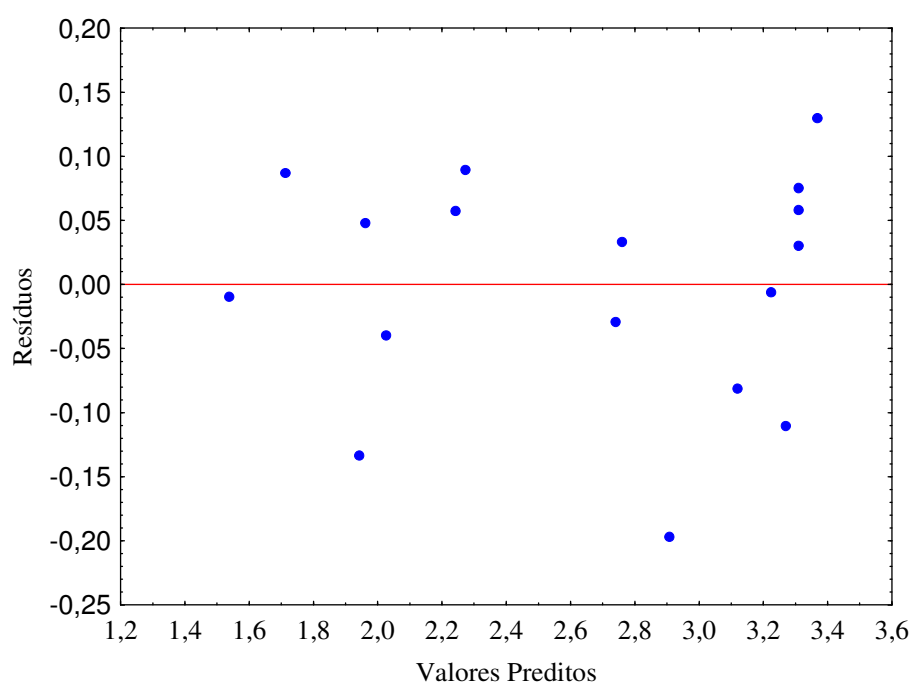


Fig. 5.15 - Distribuição dos resíduos em função dos valores preditos relativo à concentração de raminose

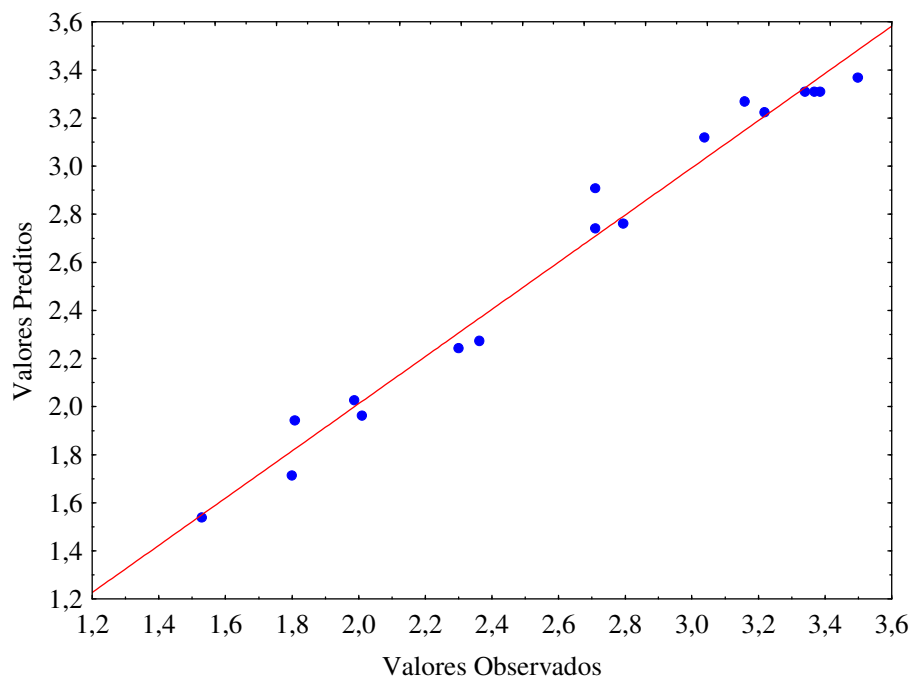


Fig. 5.16 - Valores preditos em função dos observados para a concentração de raminose

Utilizando uma rotina no *Software Maple 9.5* calculou-se o ponto estacionário (ótimo) para a produção do raminolípido. Obteve-se os seguintes valores de λ 's: $\lambda_1 = -0,4666745008$, $\lambda_2 = -0,3877097452$, $\lambda_3 = -0,1102357540$. Estes valores indicam que há um ponto de máximo para a raminose devido os sinais iguais e negativos para os λ 's.

As coordenadas $X_1 = 0,943$, $X_2 = -1,177$ e $X_3 = 0,161$ representam os valores codificados que maximizam a resposta.

Com as equações de codificação apresentadas nas equações 4.2, 4.3 e 4.4, determinou-se os valores reais das concentrações das variáveis utilizadas no PCC após a maximização da resposta raminose:

$$X_1 (\text{Efluente}) = 68,86 \text{ g/L}$$

$$X_2 (\text{NA}) = 0,30 \text{ g/L}$$

$$X_3 (\text{LCA}) = 15,81 \text{ g/L}$$

Com os valores codificados de X_1 , X_2 e X_3 no ponto de otimização, determinou-se a concentração de raminose neste ponto em 3,67 g/L, sendo próximo da concentração de raminose apresentada nos experimentos 15, 16 e 17, que são os pontos centrais e obtiveram as seguintes concentrações de raminose: 3,34, 3,37 e 3,39 g/L respectivamente (Tabela 5.2). Estes valores de concentração de raminose podem ser comparados com a produção de biossurfactante com *Pseudomonas aeruginosa* EM1 em glicerol como substrato, em que Wu

et al. (2007). Noghabi *et al.* (2010) obtiveram 4,93 g/L de raminolipídeo. em fermentação de *Pseudomonas aeruginosa* MR01 em um período de 48 horas.

O efeito das variáveis concentração de efluente, nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada residual em relação à concentração de raminose também pode ser visualizado pelos gráficos de superfícies de resposta, conforme Figuras 5.17, 5.19 e 5.21 e suas curvas de contornos (Figura 5.18, 5.20 e 5.22)

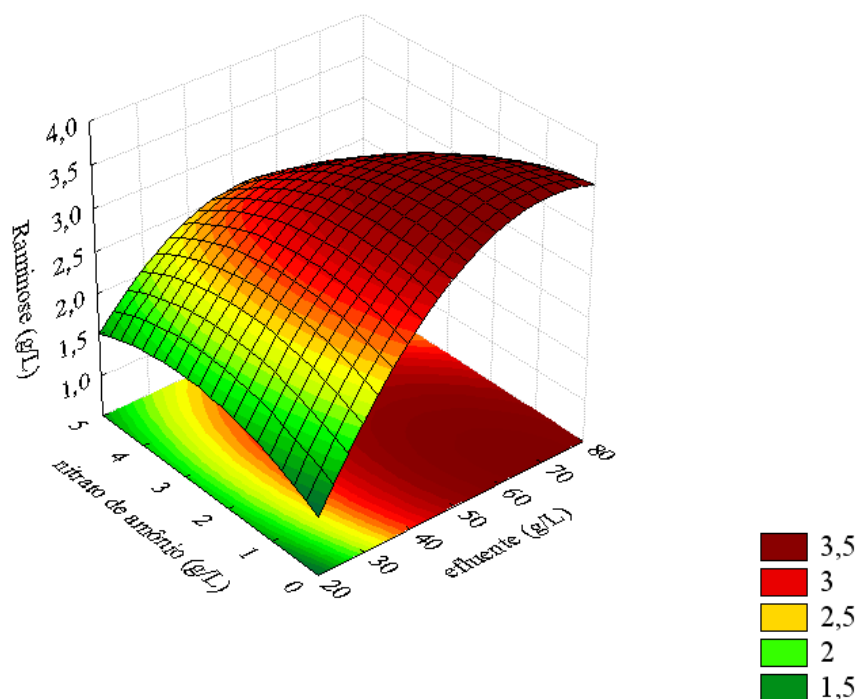


Fig. 5.17 - Superfície de resposta para síntese de raminose em relação à concentração de efluente e nitrato de amônio

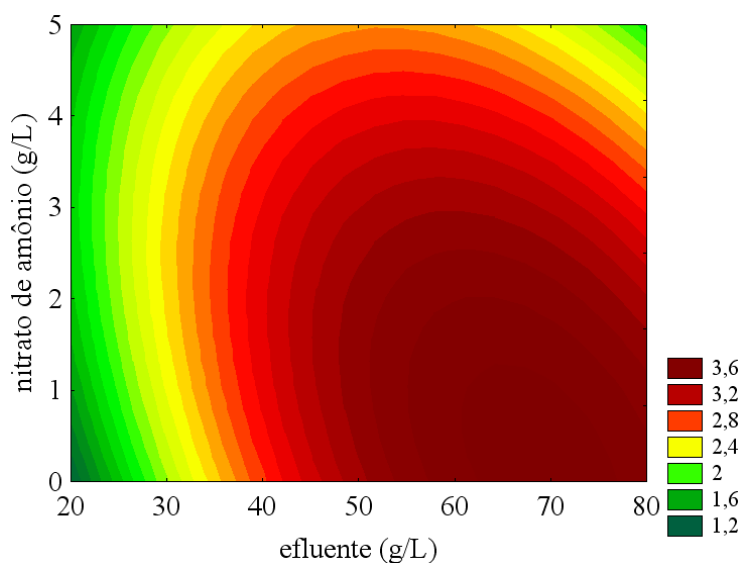


Fig. 5.18 - Curvas de contorno para síntese de raminose em relação à concentração de efluente e nitrato de amônio

Com a superfície de resposta e as curvas de contorno, respectivamente apresentados nas Figuras 5.17 e 5.18 tem-se que a faixa para os melhores resultados para a concentração de raminose está aproximadamente entre 60 a 80 g/L de efluente e 0 a 1,5 g/L de nitrato de amônio.

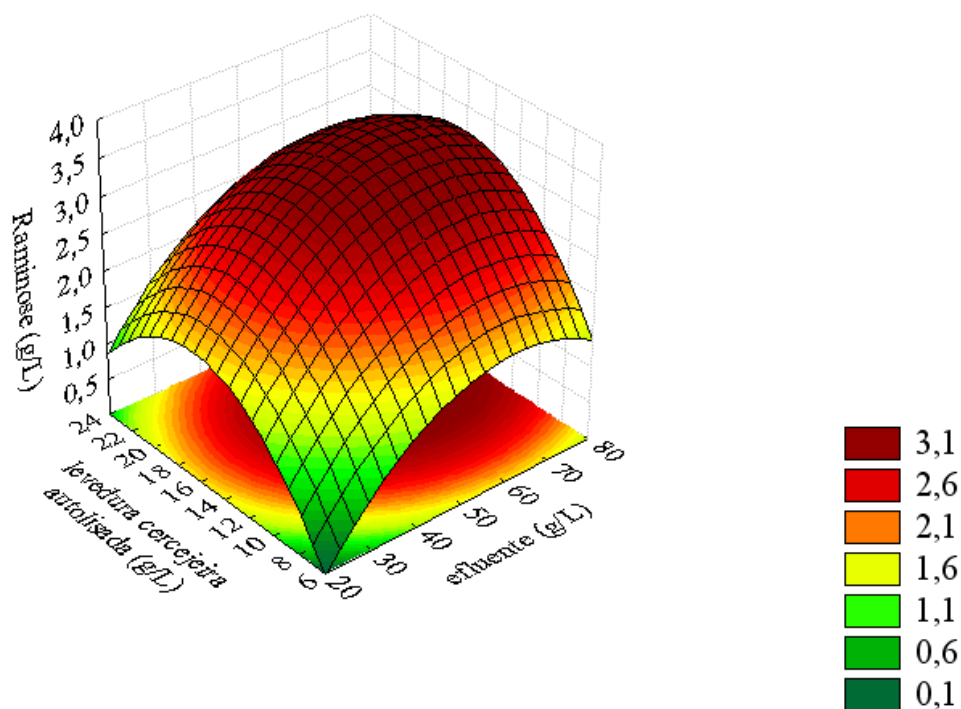


Fig. 5.19 - Superfície de resposta para síntese de raminose em relação à concentração de efluente e levedura cervejeira autolisada residual

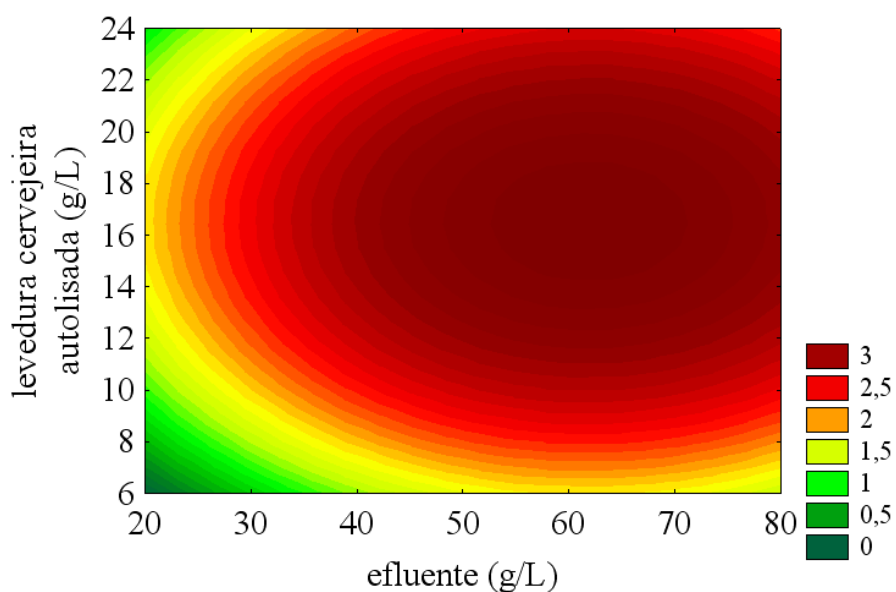


Fig. 5.20 - Curvas de contorno para síntese de raminose em relação à concentração de efluente e levedura cervejeira autolisada residual

As Figuras. 5.19 e 5.20 mostram que a faixa para o máximo de concentração de raminose está aproximadamente entre 55 a 70 g/L de efluente e 14 a 19 g/L de levedura cervejeira autolisada residual.

Santos *et al.* (2002) relatam que obtiveram uma maior quantidade raminolipídeos quando trabalharam com altos valores de uma mistura de óleos vegetais e glicerol, chegando até a 7,4 g/L em de raminolipídeos, utilizando *Pseudomonas aeruginosa* PA1, podendo chegar à quantificação da concentração de raminose utilizando fatores de transformação (BENINCASA e ACCORSINI, 2008; SOLANAS *et al.*, 2004).

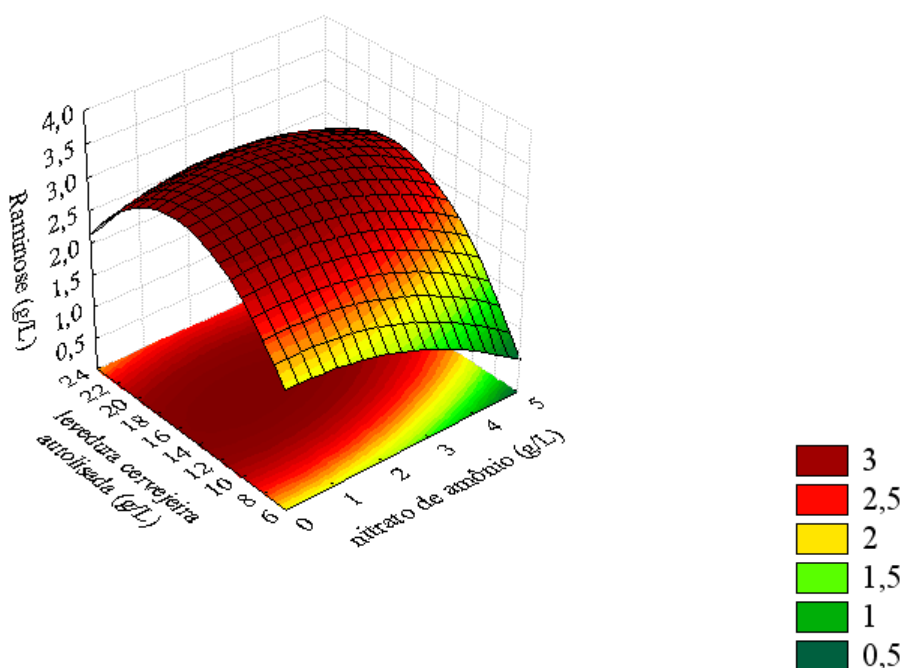


Fig. 5.21 - Superfície de resposta para síntese de raminose em relação à concentração de nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada residual

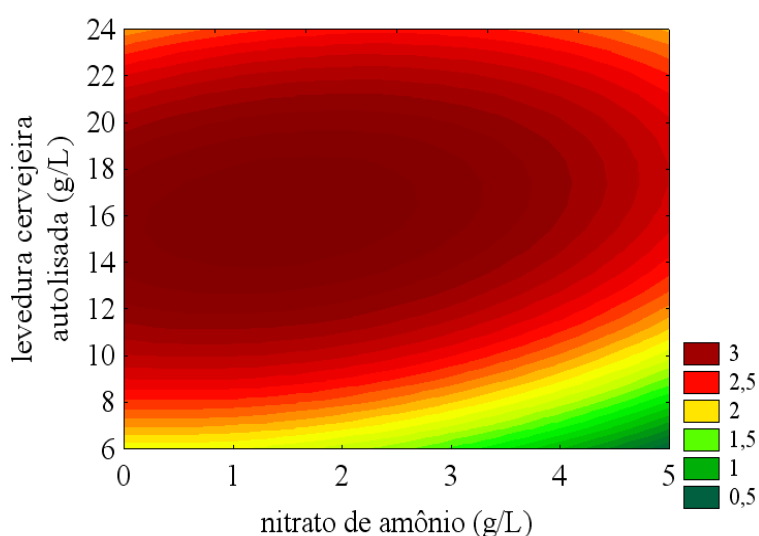


Fig. 5.22 - Curvas de contorno para síntese de raminose em relação à concentração de nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada residual

Observando a Figura. 5.21 e 5.22 pode-se afirmar que a região de máxima concentração de raminose localiza-se na faixa de 0,0 a 2,5g/L de nitrato de amônio e 14 a 17 g/L de levedura cervejeira autolisada residual.

5.5.2 - Análise do PCC para a resposta tensão superficial

Para a resposta tensão superficial, pode-se dizer que a variável isolada mais significativa foi a concentração de efluente (X_1) e depois a concentração de nitrato de amônio (X_2), conforme o Figura 5.23.

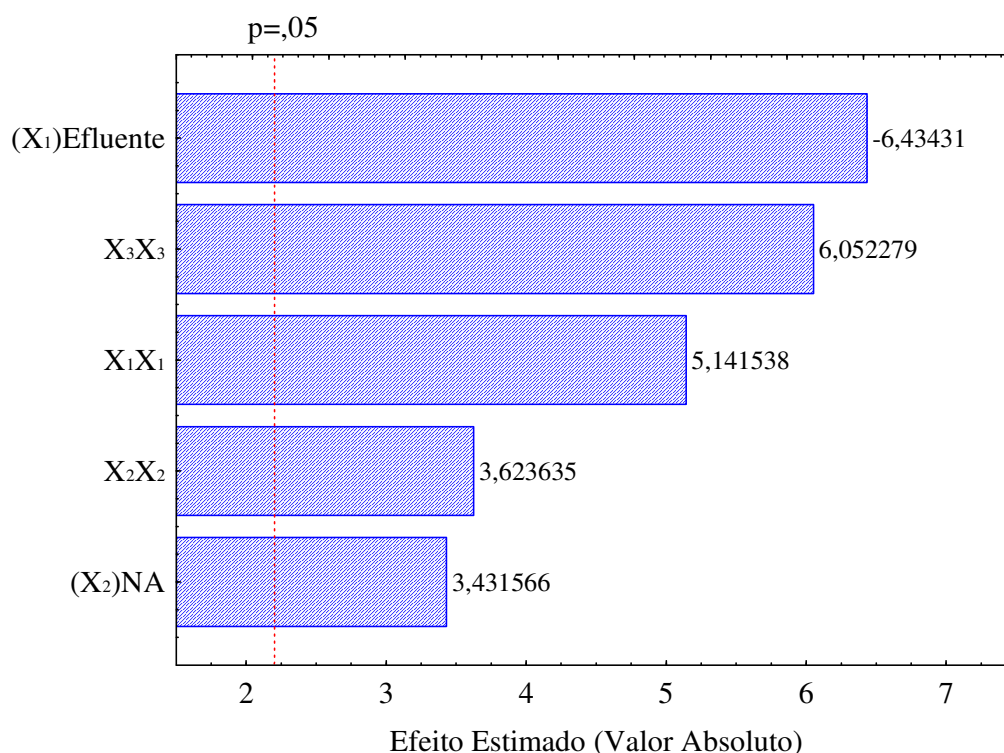


Fig. 5.23 - Diagrama de Pareto com variáveis estudadas e suas interações para tensão superficial

A equação ajustada para a tensão superficial em relação às variáveis significativas apresentadas na Figura 5.23 é descrita pela Equação 5.14:

$$\text{Tensão superficial} = 27,21836 - 0,87772X_1 + 0,46811X_2 + 0,92500X_1X_1 + 0,65192X_2X_2 + 1,08885X_3X_3 \quad (5.14)$$

A Equação 5.14 apresenta coeficiente de determinação (R^2) de 0,92, indicando que cerca de 92% dos dados experimentais se ajustam ao modelo proposto.

O sinal negativo de X_1 mostra que menores concentrações de efluente levam a uma maior tensão superficial, não sendo mais indicados para produção do biossurfactante, o que pode ser comprovado comparando os resultados obtidos para a tensão superficial nos experimentos: 1 e 5; 2 e 6; 3 e 7; 4 e 8; 9 e 10 (Tabela 5.2). O sinal positivo para X_2 mostra que maiores concentrações de nitrato de amônio proporcionam maiores valores de tensão superficial, não sendo o indicado, conforme mostra os experimentos 1 e 3; 2 e 4; 5 e 7; 6 e 8; 11 e 12. Todos os experimentos estão de acordo com Cooper e Zajic (1980), segundo ele, compostos tensoativos devem possuir tensão superficial abaixo de 40 dina/cm, e ainda que a eficiência de um biossurfactante pode ser comprovada caso esta tensão superficial esteja abaixo de 35 dina/cm.

Os valores de tensão superficial estão iguais ou abaixo de 31 dina/cm, semelhante ao valor de menor tensão superficial encontrada por Oliveira *et al.* (2008) na produção de raminolipídeos por uma linhagem de *Pseudomonas alcaligenes* a partir do óleo de palma como fonte de carbono, por ser uma fonte renovável, em fermentação por 48 horas com velocidade de agitação de 220 rpm e pH 7,0, na qual a tensão superficial foi de 31 mN/m.

A Figura 5.24 mostra a distribuição dos resíduos em torno de zero, sendo aleatória e sem nenhuma tendência. A Figura 5.25 mostra os valores preditos em função dos observados em que os observados ficaram próximos dos preditos.

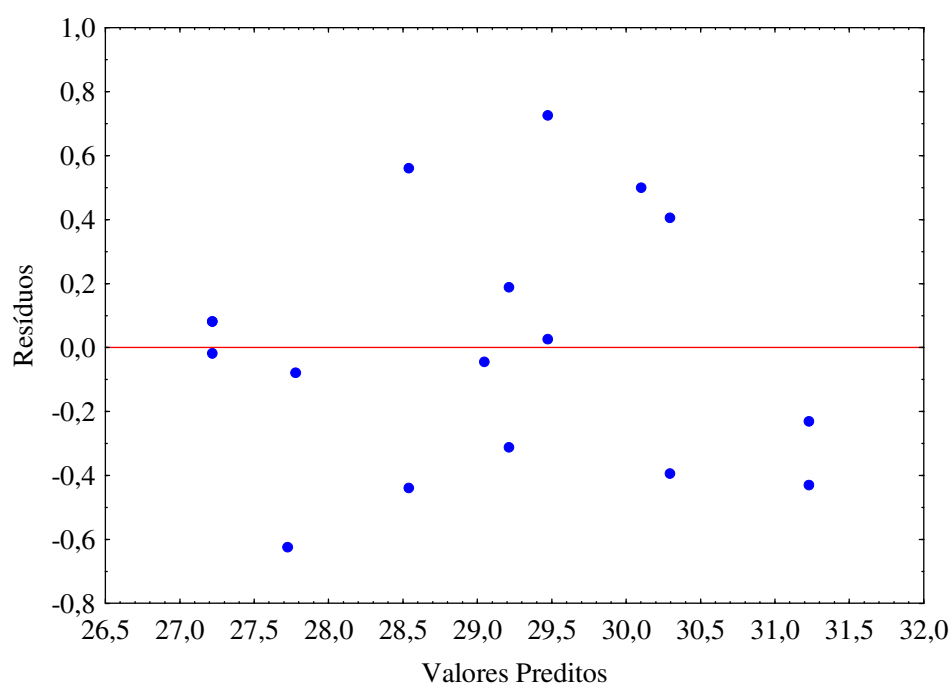


Fig. 5.24 - Distribuição dos resíduos relativo à tensão superficial

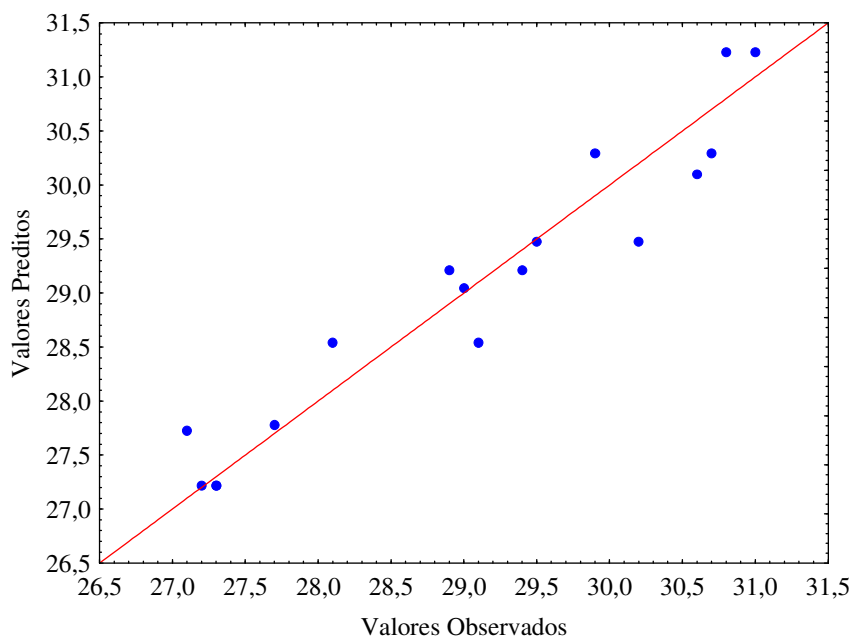


Fig. 5.25 - Valores preditos em função dos observados relativos à tensão superficial

Com um algoritmo no *Software Maple 9.5* calculou-se o ponto estacionário (ótimo), que apresentou os seguintes valores de λ 's: $\lambda_1 = 0,6202782806$, $\lambda_2 = 0,9426988377$, $\lambda_3 = 1,102792882$. Estes valores indicam um ponto de mínimo para tensão superficial devido os sinais de λ 's serem iguais e positivos. As coordenadas $X_1 = 0,518$, $X_2 = -0,434$ e $X_3 = 0,123$ representam os valores codificados que minimizaram a resposta.

Com as equações de codificação (Equações 4.2, 4.3 e 4.4), foram obtidos os valores reais das concentrações das variáveis utilizadas no PCC quando da minimização da tensão superficial:

$$X_1 (\text{Efluente}) = 60,37 \text{ g/L}$$

$$X_2 (\text{NA}) = 1,56 \text{ g/L}$$

$$X_3 (\text{LCA}) = 15,61 \text{ g/L}$$

Com os valores codificados de X_1 , X_2 e X_3 no ponto de otimização, determinou-se que a tensão superficial neste ponto foi de 26,88 dina/cm, sendo próximo ao valor da tensão superficial apresentada nos experimentos 15, 16 e 17 (27,3, 27,2 e 27,3 dina/cm respectivamente), que são os valores das tensões superficiais no ponto central do PCC. Segundo Reiser *et al.* (1993) os valores mínimos para tensão superficial encontram-se na faixa de 25 a 28 dina/cm.

Wu *et al.* (2007) produziram um biossurfactante a partir da atividade da *Pseudomonas aeruginosa* EM1 com glicose e óleo vegetal como fontes de carbono, que foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio para 26,5 dina/cm.

Pinto e Martins (2009) produziram um biossurfactante em que a tensão superficial chegou a 28 dina/cm utilizando culturas mista de bactérias em efluentes provenientes da lavagem de caminhões transportadores de combustíveis.

Yin *et al.* (2008) relataram a redução para tensão superficial de 72 para 33,9 dina/cm quando a produção do biossurfactante ocorre empregando *Pseudomonas aeruginosa* S6 em águas residuárias contendo óleo. A diminuição da tensão superficial também é relatada por Jamal *et al.* (2010), que estudaram a produção de biossurfactante a partir do óleo de palma, com teor de ácido graxo no intervalo de 21 a 25%, em fermentação com 180 rpm a 30°C, com uma cultura mista de micro-organismos. A tensão superficial inicial da produção do meio antes da inoculação foi de 54,5 mN/m e uma diminuição na tensão superficial esteve aliada ao crescimento microbiano, que teve o valor mínimo de 30,1 mN/m

O efeito das variáveis concentração de efluente, nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada residual para a tensão superficial pode ser visualizado nas superfícies de resposta mostrado nas Figuras. 5.26, 5.28 e 5.30 e suas curvas de contornos (Figuras 5.27, 5.29 e 5.31)

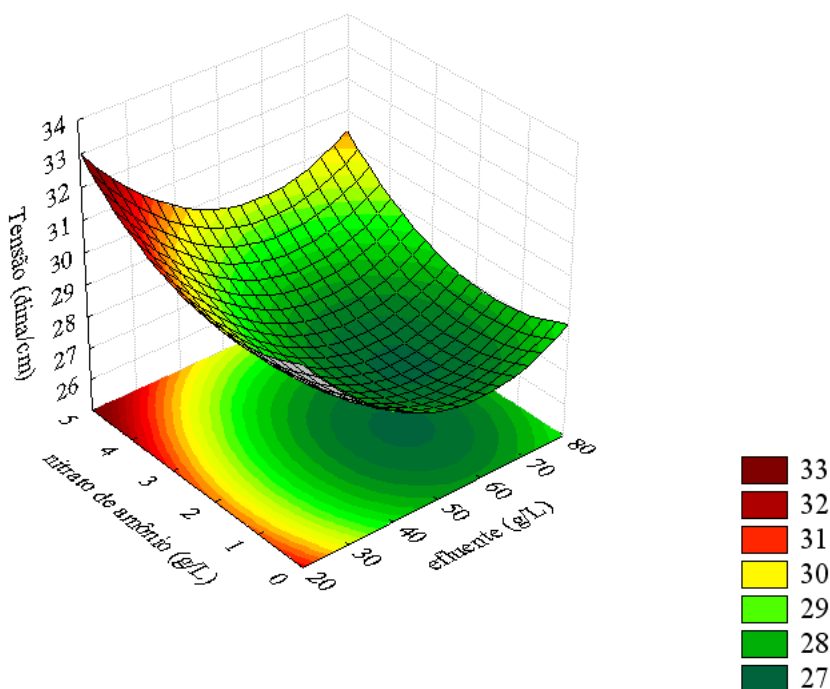


Fig. 5.26 - Superfície de resposta para tensão superficial em relação à concentração de efluente e nitrato de amônio

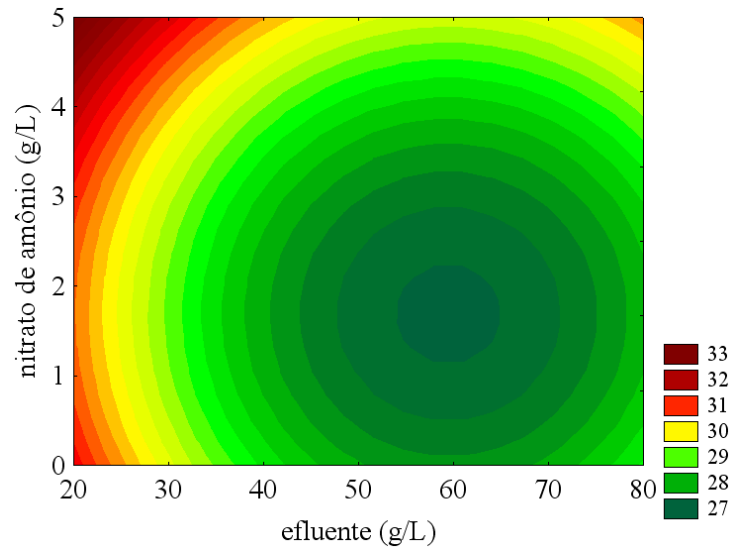


Fig. 5.27 - Curvas de contorno para tensão superficial em relação à concentração de efluente e nitrato de amônio

Com a superfície de resposta e as curvas de contorno, respectivamente apresentados nas Figuras. 5.26 e 5.27, determinou-se que a faixa para os melhores resultados para a tensão superficial (menores valores) está aproximadamente entre 55 a 65 g/L de efluente e concentração de nitrato de amônio de 1 a 2 g/L.

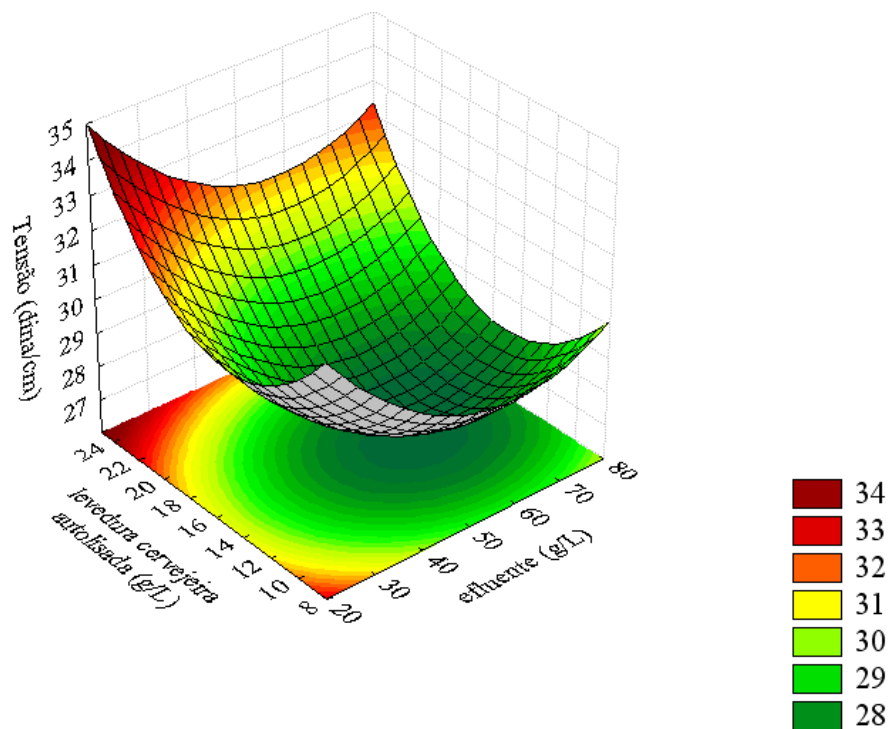


Fig. 5.28 - Superfície de resposta para tensão superficial em relação à concentração de efluente e levedura cervejeira autolisada residual.

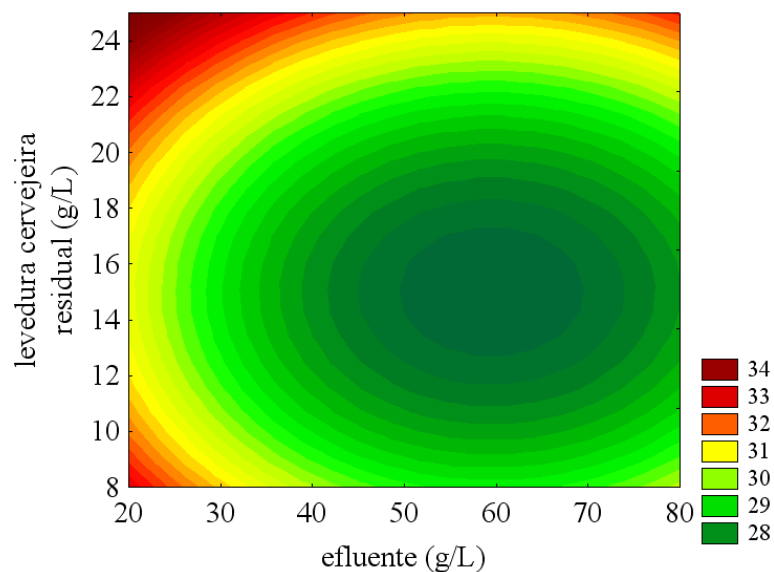


Fig. 5.29 - Curvas de contorno para tensão superficial em relação à concentração de efluente e levedura cervejeira autolisada residual.

As Figuras 5.28 e 5.29 mostram que a melhor faixa para os valores da tensão superficial está aproximadamente entre 50 a 70 g/L de efluente e concentração de levedura cervejeira autolisada residual de 14 a 17g/L.

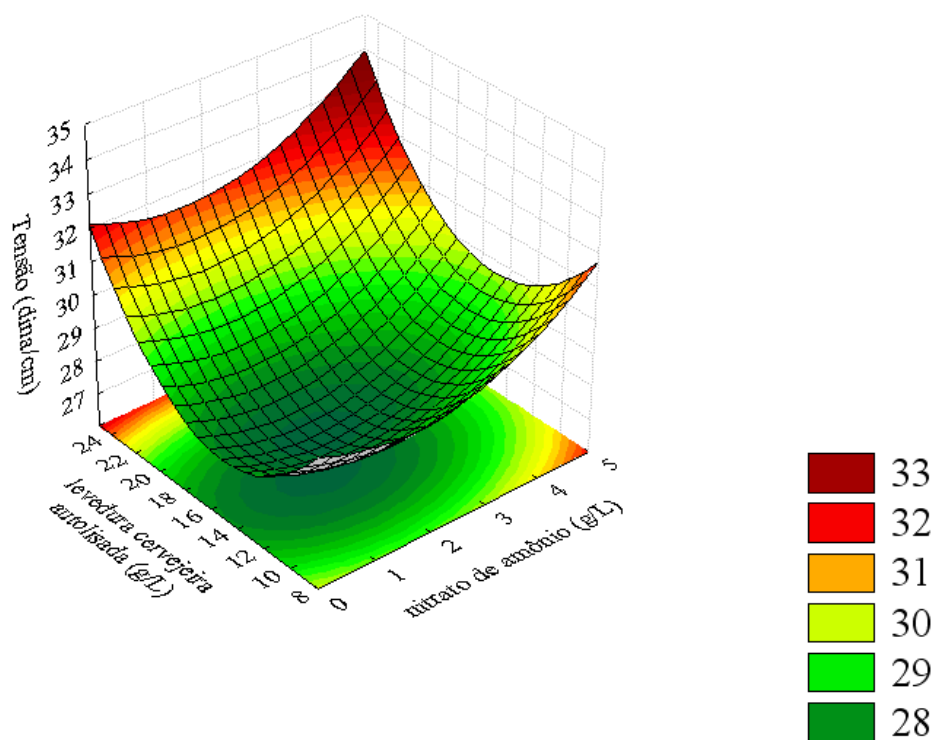


Fig. 5.30 - Superfície de resposta para tensão superficial em relação à concentração de nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada residual

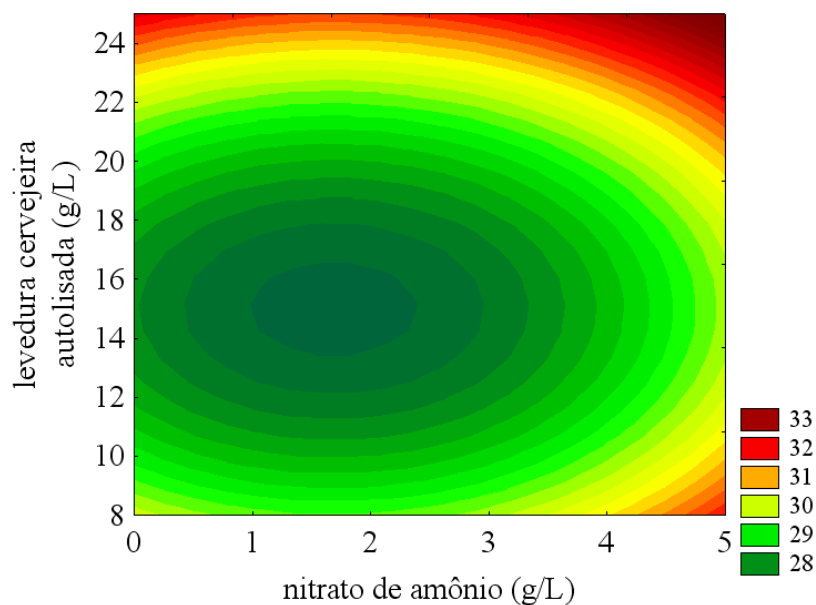


Fig. 5.31 - Curvas de contorno para tensão superficial em relação à concentração de nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada residual

Pelas Figuras 5.30 e 5.31 pode-se afirmar que a região com menores valores de tensão superficial localiza-se na faixa de 1 a 2,5 g/L de nitrato de amônio e de 14 a 16 g/L de levedura cervejeira autolisada residual.

5.5.3 - Análise do PCC para a resposta emulsificação

A Figura 5.32 apresenta para a resposta índice de emulsificação as variáveis isoladas significativas: a quantidade de LCA (X_3), seguido pela concentração de efluente (X_1), e por NA (X_2).

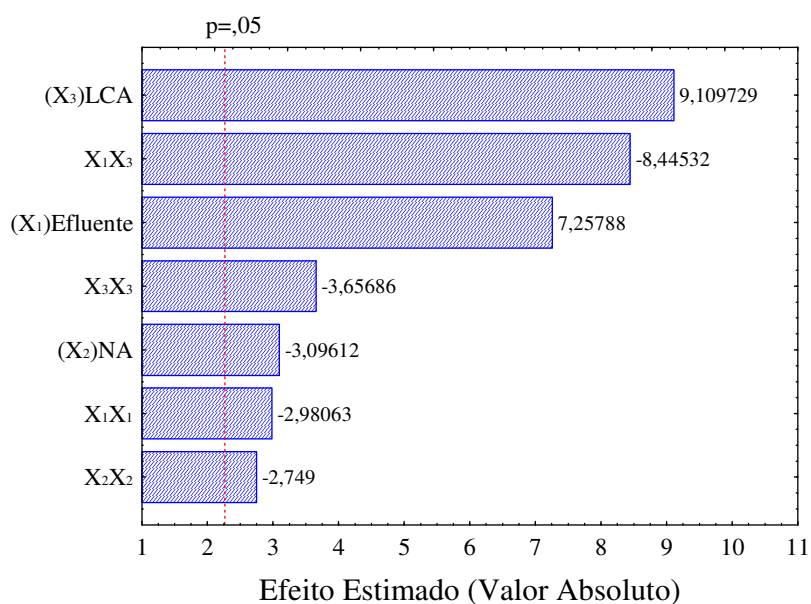


Fig. 5.32 - Diagrama de Pareto com variáveis estudadas para o índice de emulsificação

A equação ajustada para o índice de emulsificação (Equação 5.15) é dada como:

$$\begin{aligned} \text{Índice de Emulsificação} = & 100,0478 + 4,0225 X_1 - 1,7160 X_2 + 5,0489 X_3 - 2,1787 X_1 X_1 \\ & - 2,0094 X_2 X_2 - 2,6729 X_3 X_3 - 5,6512 X_1 X_3 \end{aligned} \quad (5.15)$$

A Equação 5.15 apresentou coeficiente de determinação (R^2) de 0,96, indicando que cerca de 96% dos dados experimentais se ajustam ao modelo proposto. Os sinais positivos de X_1 e X_3 mostram que maiores concentrações de efluentes e LCA proporcionam maior índice de emulsificação, podendo ser um indicativo de melhor produção do biossurfactante. Este resultado está de acordo com os observados nos experimentos: 1 e 6; 3 e 8; 9 e 14, apresentados na Tabela 5.2. O coeficiente negativo em X_2 mostra que quando se trabalha com um nível menor de concentração de nitrato de amônio obtêm-se maiores índices de emulsificações, conforme comparação nos experimentos: 1 e 3; 5 e 7, 6 e 8; 11 e 12.

Pelo *Software Maple 9.5* tem-se os seguintes valores de λ 's: $\lambda_1 = -5,283871889$, $\lambda_2 = -2,063112051$, $\lambda_3 = 0,4859839405$. Estes valores indicam que há um ponto de sela para a emulsificação devido os sinais de λ 's serem diferentes.

As coordenadas $X_1 = 0,433$, $X_2 = -0,512$ e $X_3 = 0,468$ representam os valores codificados que maximizam a resposta.

Com as equações de codificação apresentadas nas equações 4.2, 4.3 e 4.4, determinou-se os valores reais das concentrações das variáveis utilizadas no PCC na condição da maximização da resposta raminose:

$$X_1 (\text{Efluente}) = 58,66 \text{ g/L}$$

$$X_2 (\text{NA}) = 1,43 \text{ g/L}$$

$$X_3 (\text{LCA}) = 17,34 \text{ g/L}$$

Com os valores codificados de X_1 , X_2 e X_3 no ponto de otimização, determinou-se que o índice de emulsificação neste ponto era de 100%, sendo iguais ao índice de emulsificação apresentado nos pontos centrais. Estes valores indicam que ocorreu a produção do biossurfactante, assim como Wu *et al.* (2007), que obteve valores acima de 70% para o índice de emulsificação na produção de biossurfactante a partir de glicose e glicerol com *Pseudomonas aeruginosa* EM1 para avaliar a produção de raminolipídeos.

Oliveira *et al.* (2008) também obtiveram índices de emulsificação acima de 70%, para querosene para raminolipídeos produzidos por linhagem de *Pseudomonas alcaligenes* a partir do óleo de palma.

Segundo Jamal *et al.* (2010), a emulsificação também é causada pela contínua agitação, o que também contribui para uma redução da tensão superficial.

Percebe-se pela distribuição dos resíduos apresentados na Figura 5.33, que há uma distribuição em torno de zero, aleatória e sem tendência. A Figura 5.34 mostra os valores preditos em função dos observados. Verifica-se que os observados ficaram próximos dos preditos.

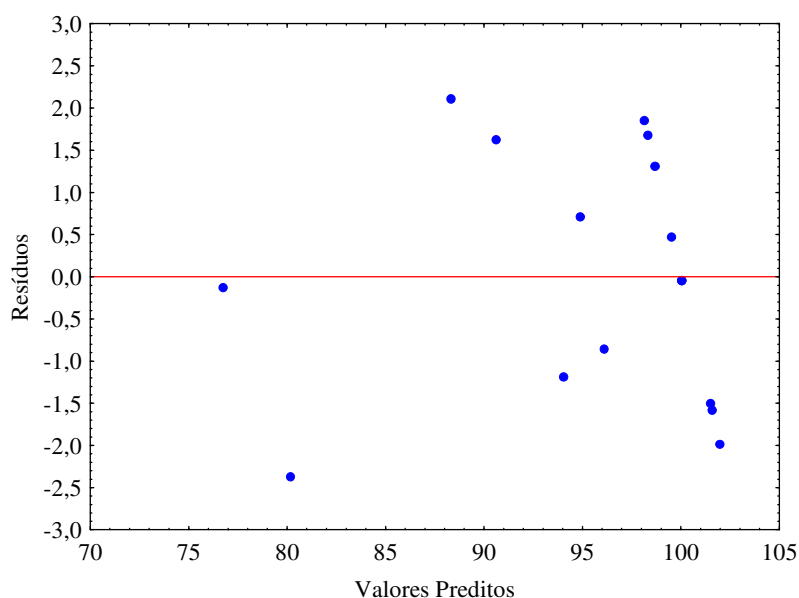


Fig. 5.33 - Distribuição dos resíduos relativo ao índice de emulsificação

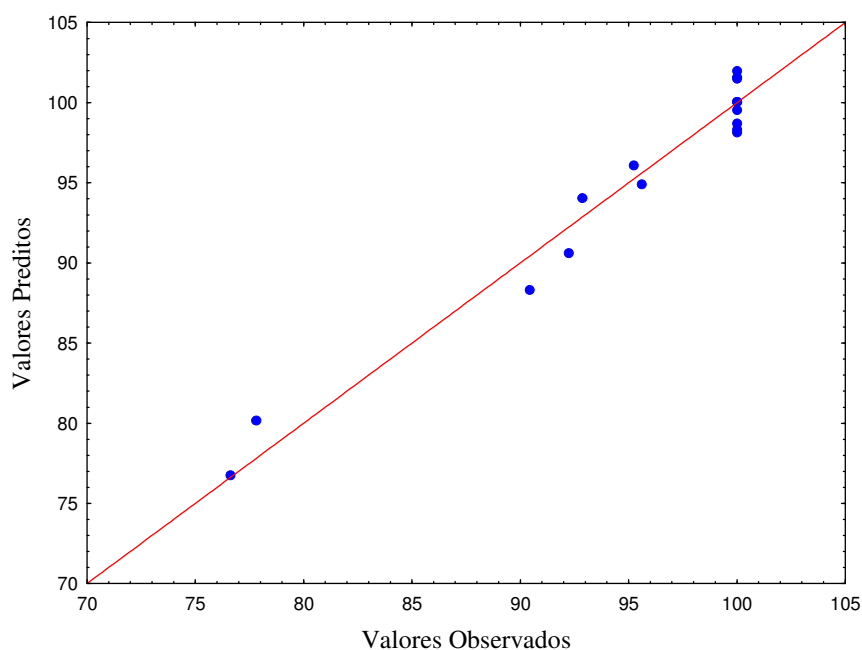


Fig. 5.34 - Valores preditos em função dos observados relativos ao índice de emulsificação

O efeito das variáveis concentração de efluente, concentração de nitrato de amônio e concentração de levedura cervejeira autolisada residual para o índice de emulsificação pode ser visualizado nas superfícies de resposta das Figuras 5.35, 5.37 e 5.39 e suas curvas de contornos (Figuras. 5.36, 5.38 e 5.40)

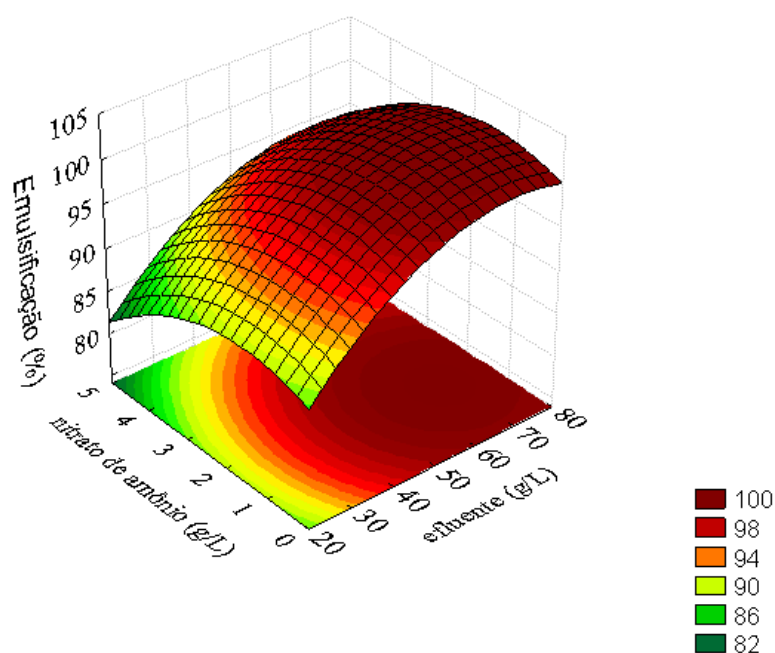


Fig. 5.35 - Superfície de resposta para emulsificação em relação à concentração de efluente e nitrato de amônio

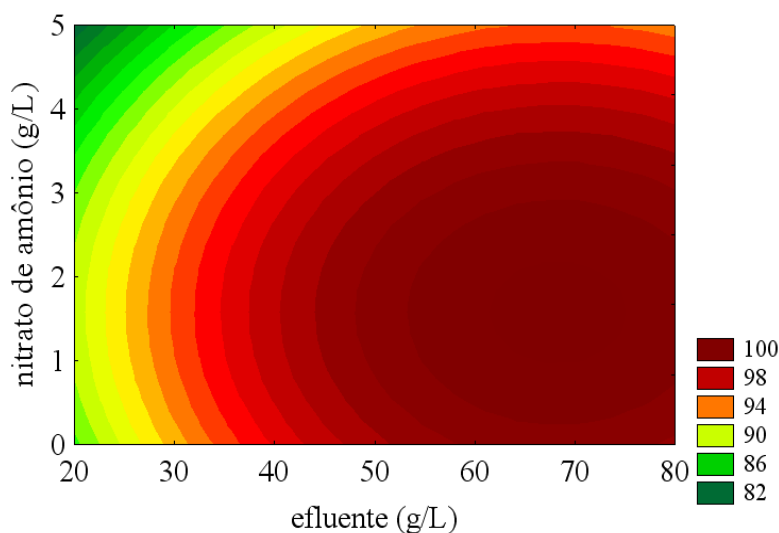


Fig. 5.36 - Curvas de contorno para emulsificação em relação à concentração de efluente e nitrato de amônio

Com a superfície de resposta e as curvas de contorno, respectivamente apresentados na Figura 5.35 e Figura 5.36 determinou-se a faixa para os melhores valores de índice de emulsificação entre 60 a 80 g/L para a concentração de efluente e entre 0 a 2,5 g/L para a concentração de nitrato de amônio.

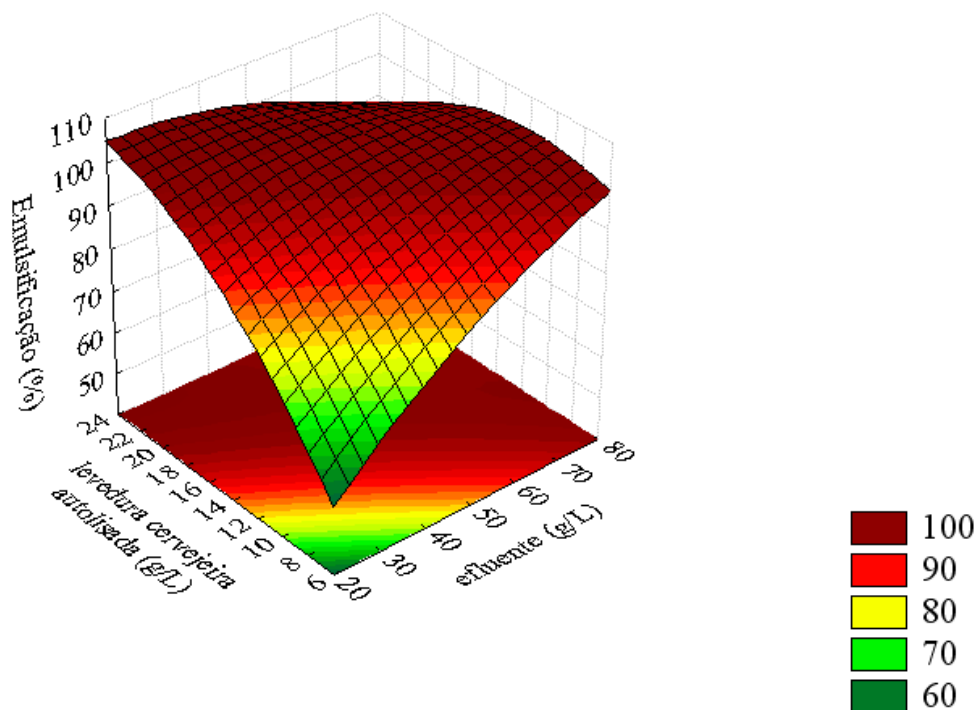


Fig. 5.37 - Superfície de resposta para emulsificação em relação à concentração de efluente e levedura cervejeira autolisada residual

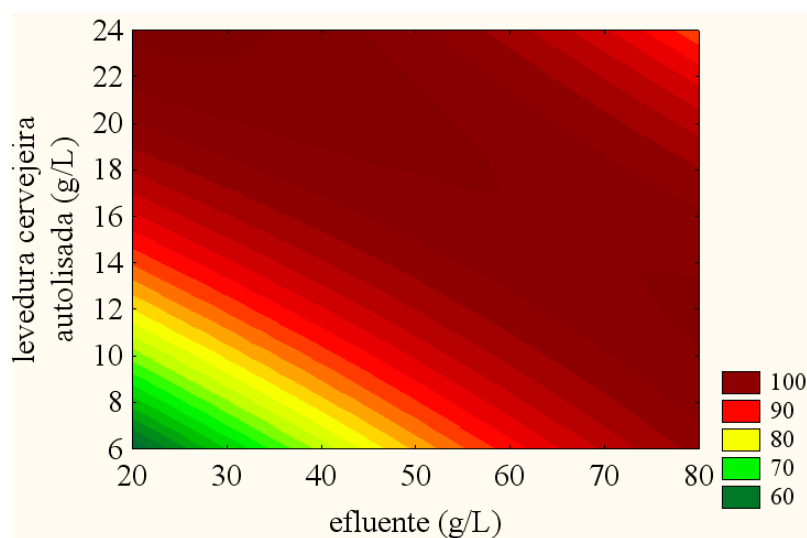


Fig. 5.38 - Curvas de contorno para emulsificação em relação à concentração de efluente e levedura cervejeira autolisada residual

As Figuras 5.37 e 5.38 mostram que a faixa que maximiza os valores do índice de emulsificação para baixa concentração de efluente é alta concentração de levedura cervejeira autolisada residual e para alta concentração de efluente é baixa quantidade de LCA.

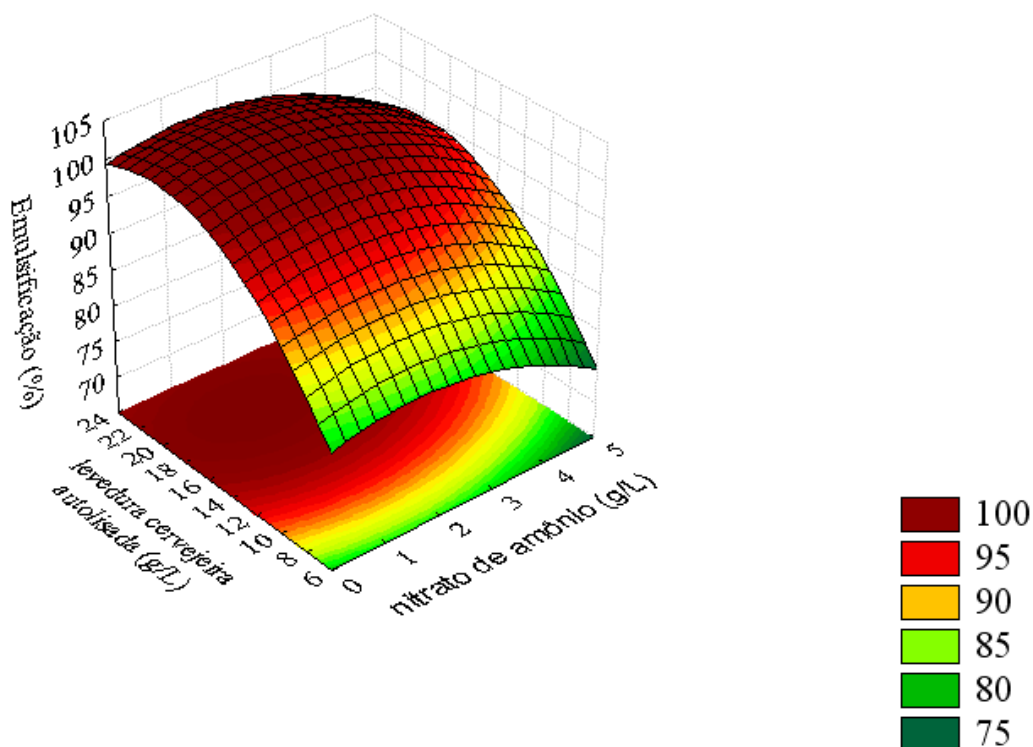


Fig. 5.39 - Superfície de resposta para emulsificação em relação à concentração de nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada residual

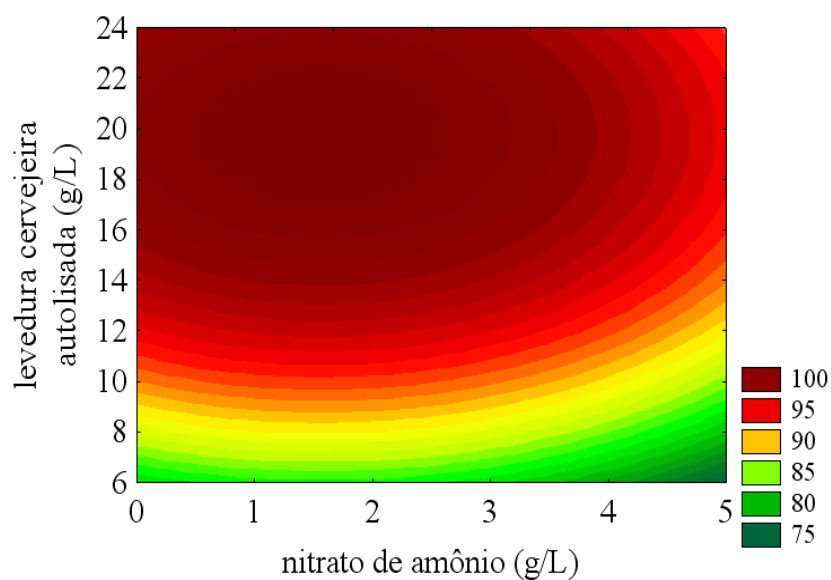


Fig. 5.40 - Curvas de contorno para emulsificação em relação à concentração de nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada residual

Analisando as Figuras. 5.39 e 5.40 pode-se afirmar que a região de maximização para o índice de emulsificação localiza-se na faixa de 0 a 2,5 g/L de nitrato de amônio e de 16 a 22 g/L de levedura cervejeira autolisada residual.

5.5.4 - Análise do PCC para a resposta concentração final de células

As variáveis isoladas que mais tiveram influência no crescimento celular (X_f) foram: concentração de levedura cervejeira autolisada residual (X_3) e concentração de efluente (X_1), conforme Figura 5.41.

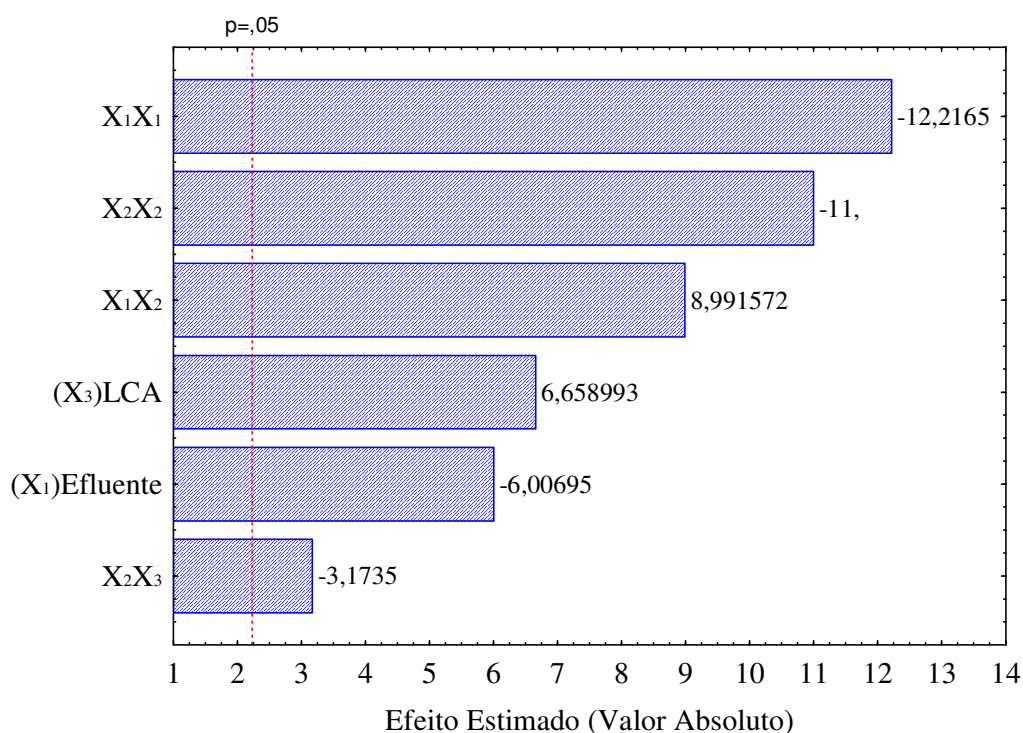


Fig. 5.41 - Diagrama de Pareto com variáveis estudadas para resposta concentração final de células

A Equação 5.16 representa a resposta ajustada para o crescimento celular, em relação às variáveis significativas apresentadas na Figura 5.41:

$$\begin{aligned} \text{Concentração final de células} = & 3,584055 - 0,235162X_1 + 0,260689X_3 - 0,630746X_1X_1 \\ & - 0,567937X_2X_2 + 0,426000X_1X_2 - 0,150000X_2X_3 \end{aligned} \quad (5.16)$$

A Equação 5.16 tem coeficiente de determinação (R^2) de 0,98, indicando que 98% dos dados experimentais ajustam ao modelo. O coeficiente de X_3 positivo indica que maiores concentrações de células foram obtidas para maiores concentrações de LCA, conforme

comparação nos experimentos 1 e 2; 3 e 4; 5 e 6; 7 e 8; 13 e 14 (Tabela 5.2). O sinal negativo para X_1 mostra que menores concentrações de efluente proporcionam maior crescimento celular, conforme experimentos: 1 e 5; 2 e 6; 9 e 10.

A Figura 5.42 mostra a distribuição dos resíduos em torno de zero, com uma distribuição dos resíduos aleatória em torno de zero, sem nenhuma tendência. A Figura 5.43 mostra os valores preditos em função dos observados, indicando que os valores observados ficaram próximos aos preditos.

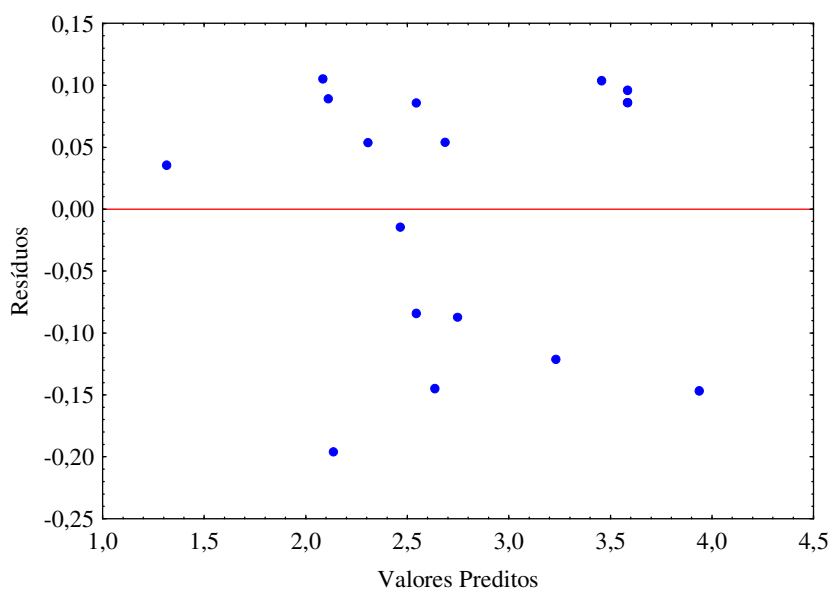


Fig. 5.42 - Distribuição dos resíduos relativo à concentração final de células

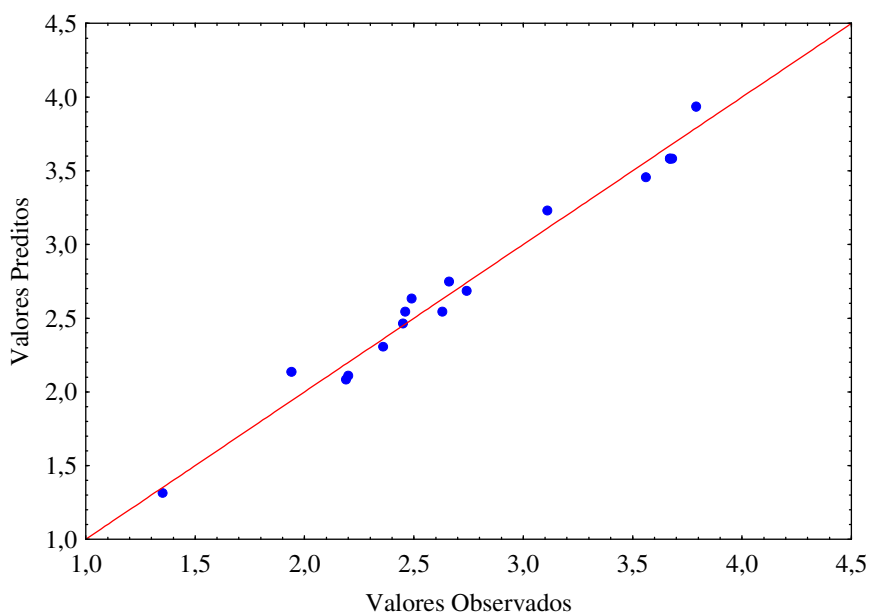


Fig. 5.43 - Valores preditos em função dos observados relativos à concentração final de células

O efeito das variáveis efluente, nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada residual para a concentração final de células pode ser visualizado pela superfície de resposta, conforme as Figuras 5.44, 5.46 e 5.48 e suas curvas de contorno (Figuras 5.45, 5.47 e 5.49)

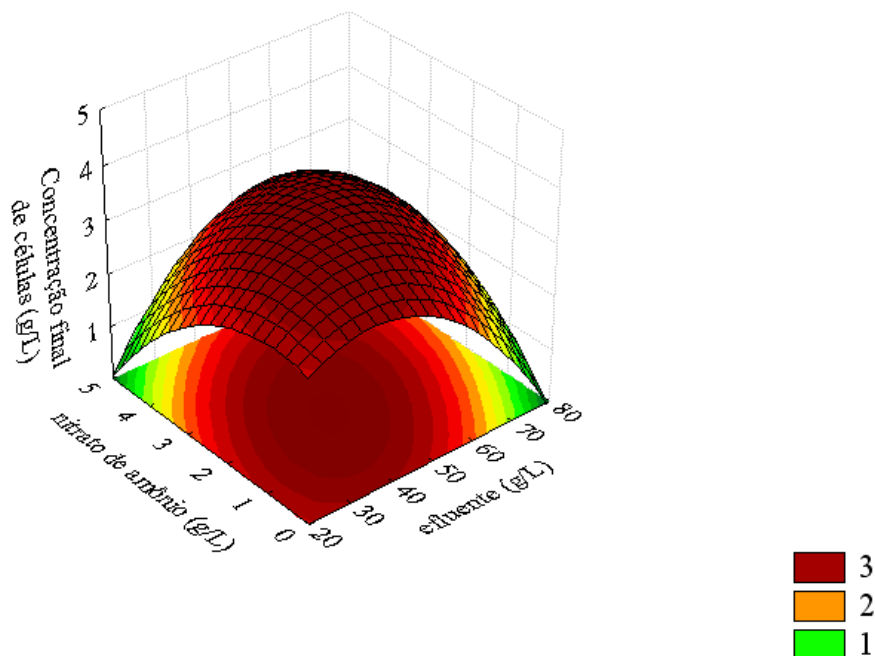


Fig. 5.44 - Superfície de resposta para concentração final de células em relação à concentração de efluente e nitrato de amônio

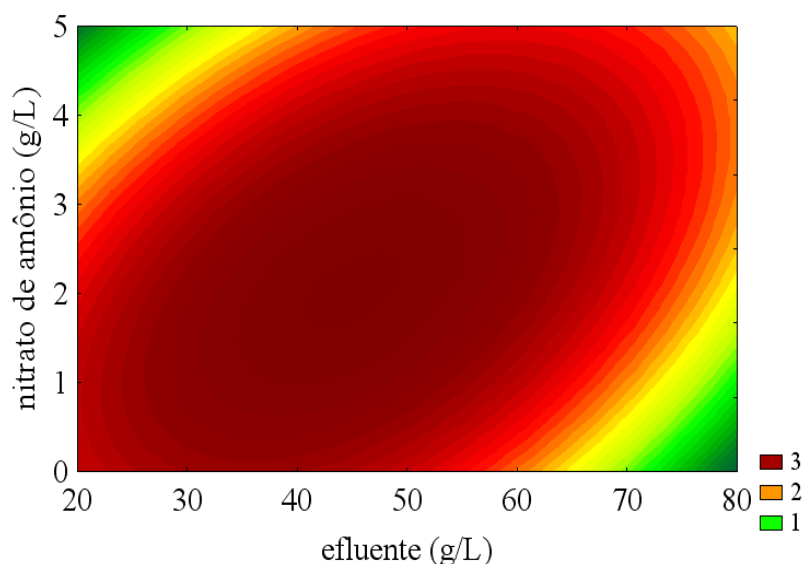


Fig. 5.45 - Curvas de contorno para concentração final de células em relação à concentração de efluente e nitrato de amônio

Com a superfície de resposta e as curvas de contorno, respectivamente apresentados nas Figuras 5.44 e 5.45 obteve-se a faixa para os melhores resultados para concentração final de células situa-se entre 30 e 60 g/L de efluente e entre 0,5 a 3,5g/L para o nitrato de amônio.

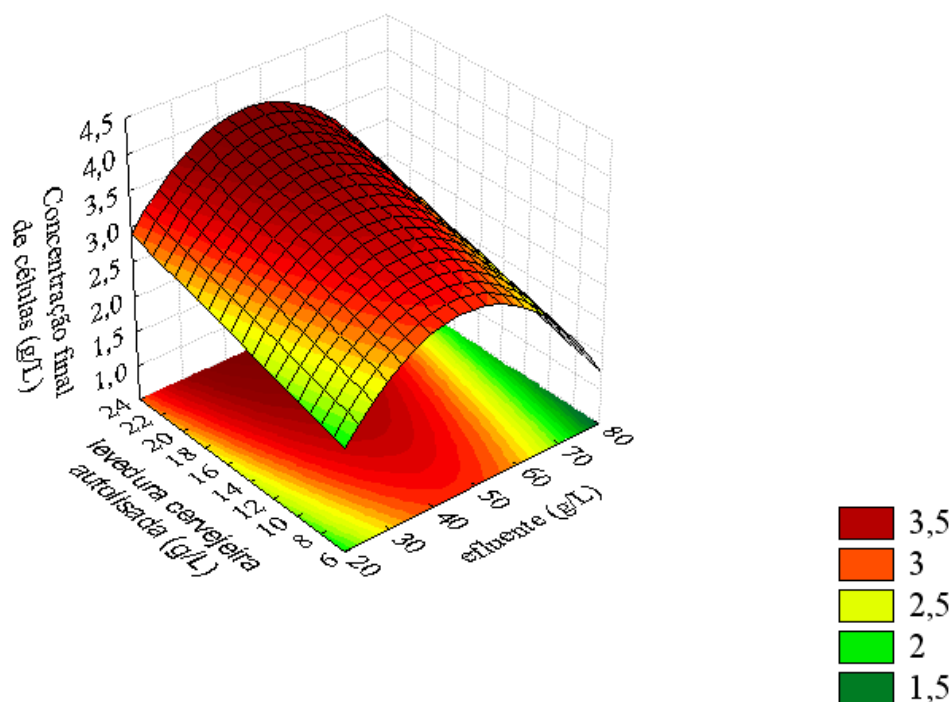


Fig. 5.46 - Superfície de resposta para concentração final de células em relação à concentração de efluente e levedura cervejeira autolisada residual

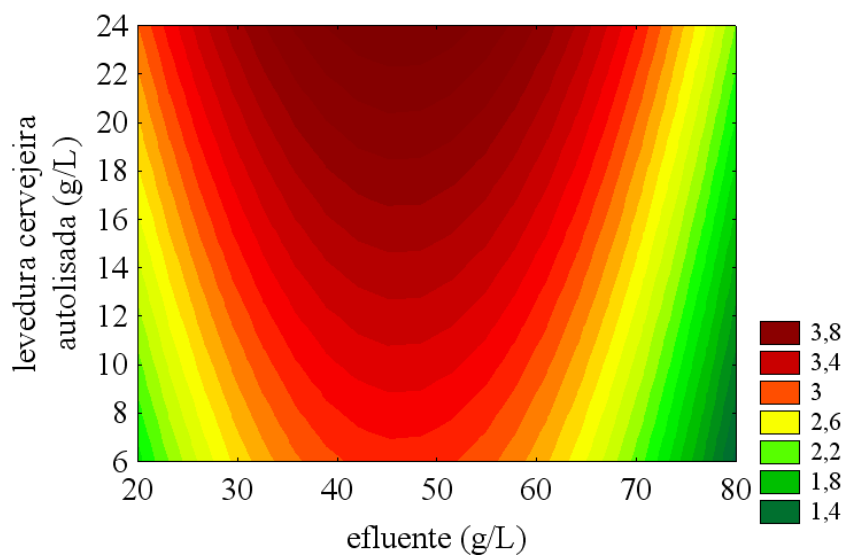


Fig. 5.47 - Curvas de contorno para concentração final de células em relação à concentração de efluente e levedura cervejeira autolisada residual

As Figuras 5.46 e 5.47 mostram que a melhor faixa para a maximização da concentração final de células encontra-se entre 40 a 55 g/L de efluente e valores acima de 23 g/L de levedura cervejeira autolisada residual.

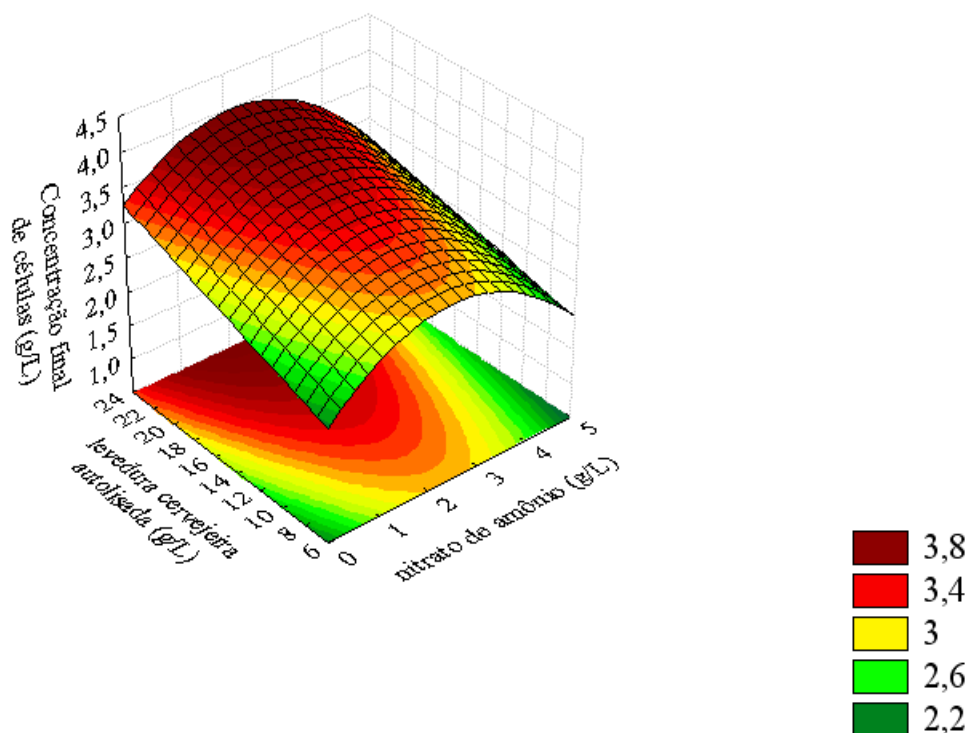


Fig. 5.48 - Superfície de resposta para concentração final de células em relação à concentração de nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada residual

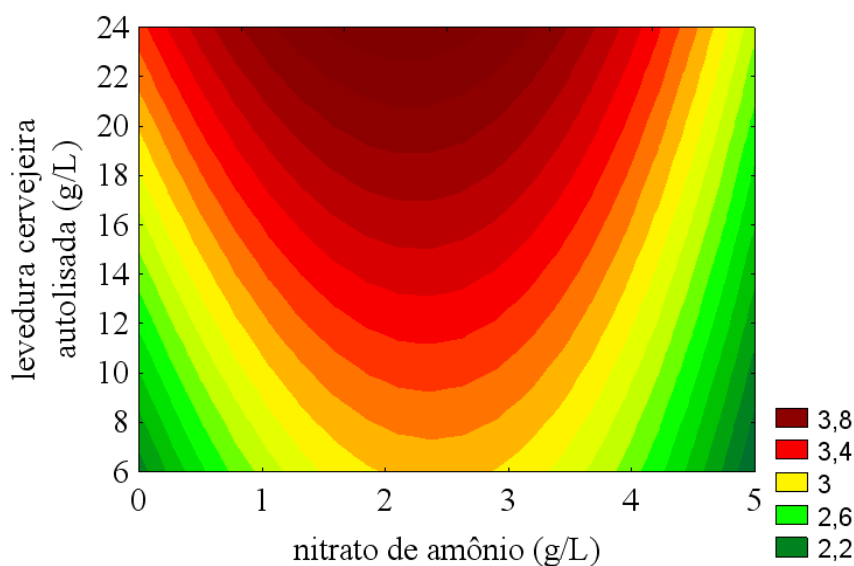


Fig. 5.49 - Curvas de contorno para concentração final de células em relação à concentração de nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada residual

A região com os melhores valores para a concentração final de células conforme mostrado nas Figuras 5.48 e 5.49 localiza-se entre 1,5 a 3 g/L para o nitrato de amônio e valores acima de 22 g/L para a levedura cervejeira autolisada residual.

Com a utilização do algoritmo implementado pelo *Software Maple 9.5* tem-se os seguintes valores de λ 's: $\lambda_1 = -0,8155495773$, $\lambda_2 = -0,4000686161$, $\lambda_3 = -0,05672380669$,

tendo um ponto de máximo para a concentração celular devido aos sinais iguais e negativos desses parâmetros. As coordenadas $X_1 = -0,501$, $X_2 = -0,658$ e $X_3 = 2,592$ representam os valores codificados que maximizam a resposta.

Os valores reais das concentrações das variáveis utilizadas no PCC, calculados com auxílio das equações de codificação (Equações 4.2, 4.3 e 4.4) que maximizam a concentração celular são:

$$X_1 (\text{Efluente}) = 39,99 \text{ g/L}$$

$$X_2 (\text{NA}) = 1,18 \text{ g/L}$$

$$X_3 (\text{LCA}) = 27,96 \text{ g/L}$$

No ponto de otimização, determinou-se que a concentração celular é de 4,00 g/L, segundo o *Software Maple*, sendo próximo à concentração celular apresentada nos Experimentos 15, 16 e 17 (3,68, 3,67 e 3,67 g/L respectivamente apresentados na Tabela 5.2), que são o pontos central do PCC e suas réplicas. Este valor é próximo ao crescimento celular relatado por Abouseoud *et al.* (2007), que obteve crescimento celular de 3,3 g/L em uma fermentação com *Pseudomonas fluorescens* utilizando como fonte de nitrogênio nitrato de sódio.

5.5.5 - Comparação entre as faixas ótimas para a concentração de raminose, tensão superficial, índice de emulsificação e concentração final de células

A Tabela 5.3 apresenta os resultados médios obtidos nos pontos centrais dos experimentos do PCC apresentado na Tabela 5.2 e os valores reais da concentração de cada variável obtido com a maximização das respostas concentração de raminose, índice de emulsificação, concentração final de células e o ponto com menor valor de tensão superficial apresentados nos itens 5.5.1, 5.5.2, 5.5.3 e 5.5.4, comparando as faixas ótimas obtidas pela técnica de superfície de resposta e o ponto ótimo gerado pelo algoritmo do *Software Maple* 9.5.

Tab. 5.3 - Resultados das melhores concentrações de efluente, nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada residual

Experimentos	Efluente (g/L)	NA (g/L)	LCA (g/L)
Ponto central	50	2,3	15
Faixa ótima para raminose	60 a 70	0 a 1,5	14 a 17
Ponto ótimo Raminose (<i>Maple</i>)	68,86	0,30	15,81
Faixa ótima para tensão	55 a 65	1 a 2	14 a 16
Ponto ótimo Tensão (<i>Maple</i>)	60,37	1,56	15,61
Faixa ótima para índice de emulsificação	60 a 80	0 a 2,5	16 a 22
Ponto ótimo índice de emulsificação (<i>Maple</i>)	58,6	1,4	17,3
Faixa ótima para células	40 a 55	1,5 a 3,0	≥22
Ponto ótimo Células (<i>Maple</i>)	39,99	1,18	27,96

NA – concentração de nitrato de amônio; LCA – concentração de levedura cervejeira autolisada residual.

Analisando as regiões de otimização, obtidas pelas superfícies de resposta, para as variáveis concentração de raminose, tensão superficial, índice de emulsificação determinou-se que as melhores condições foram: concentração de efluente 60 g/L, levedura cervejeira autolisada residual de 15 g/L e sem a adição de nitrato de amônio. A escolha da concentração de efluente foi baseada no fato deste valor ser o menor obtido para esta variável dentro da região de otimização. A seleção de 15 g/L de levedura cervejeira autolisada residual também baseou-se no fato de que este valor foi um dos menores dentro da faixa de otimização e também nos resultados satisfatórios obtidos na condição central do planejamento.

A escolha de não adicionar nitrato de amônio foi baseado na região de otimização obtida nas superfícies de resposta e no resultado do experimento 11 (Tabela 5.2), no qual obteve-se respostas satisfatórias para a produção de raminose, tensão superficial e índice de emulsificação, sem a adição de fonte de nitrogênio.

Por outro lado, vários pesquisadores tem associado a síntese de raminolipídeo à exaustão da fonte de nitrogênio e início da fase estacionária de crescimento (RAMANA e KARANTH, 1989; GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984; MULLIGAN e GIBBS, 1989). Aumentos significativos na produção de raminolipídeos foram observados sob condição de limitação de nitrogênio (OCHSNER e REISER, 1995; LANG e WULLBRANDT, 1999). Sylđatk *et al.* (1985) mostraram que a limitação de nitrogênio é responsável não somente pelo aumento da produção de biossurfactante, como também pela mudança na composição do biossurfactante produzido. Em relação à fonte de nitrogênio, uma utilização com nitrato foi

relatado por Robert *et al.* (1989) como sendo a melhor fonte de nitrogênio para produção de biossurfactante pela cepa *P. aeruginosa* 44T1.

Os resultados mostram que o ponto central foi uma condição satisfatória em relação as variáveis estudadas. Porém, acredita-se que, como a concentração de efluente foi uma variável com efeito significativo nas três respostas, o aumento da mesma possa compensar a não adição de nitrogênio no processo fermentativo. Um dos parâmetros que foi sempre considerado na seleção da condição de otimização foi a redução de custo de processo. Por isso, a escolha das condições com menor valor das variáveis dentro da região de otimização foi realizada para a redução de gastos no processo.

O efeito das fontes de carbono e nitrogênio para a produção de raminolipídeos utilizando *Pseudomonas aeruginosa* PA1 foi estudado por Reis *et al.* (2010).

A variável concentração celular não foi considerada para a seleção desta condição, porque como já mencionado anteriormente, a condição de maior produção celular promoveu os melhores resultados de produção de raminose, tensão superficial e índice de emulsificação e esta condição está relacionada a maior geração de biomassa residual no processo fermentativo

5.6 - Reprodutibilidade do processo fermentativo com melhores condições experimentais do PCC

A reprodutibilidade do processo fermentativo foi feita objetivando confirmar os resultados obtidos nos pontos centrais do PCC (Experimentos 15, 16 e 17 da Tabela 5.2). Esta reprodutibilidade utilizou as concentrações de efluente de 60 g/L, sem adição de nitrato de amônio e concentração de levedura cervejeira autolisada residual em 15 g/L, selecionadas com base nas superfícies de respostas apresentadas pelo *Software Statistica 7.1* no item 5.5. O teste de reprodutibilidade foi realizado com nível de aeração 0,5 vvm, velocidade de agitação 550 rpm e concentração inicial do inóculo $1,0 \text{ g/L} \pm 0,2 \text{ g/L}$ de células de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. A tabela 5.4 apresenta a comparação dos resultados obtidos na condição selecionada com base nas superfícies de resposta e os resultados dos pontos centrais do planejando composto central.

Tab. 5.4 - Comparativo entre os resultados dos pontos centrais do PCC e reprodução melhor ponto na condição otimizada

Exp.	Efluente (g/L)	NA (g/L)	LCA (g/L)	RM (g/L)	TS (dina/cm)	IE (%)	X _f (g/L)
Melhor ponto	60	0,0	15,0	3,84±0,1	27,5± 0,5	100	3,65± 0,4
15	50	2,3	15	3,34	27,3	100	3,68
16	50	2,3	15	3,37	27,2	100	3,67
17	50	2,3	15	3,39	27,3	100	3,67

NA – concentração de nitrato de amônio; LCA – concentração de levedura cervejeira autolisada residual; RM – concentração de raminose; TS – tensão superficial; IE – índice de emulsificação; X_f – concentração final de células

De acordo com as respostas obtidas na condição selecionada pode-se dizer que a escolha da condição foi satisfatória, pois apesar de utilizar uma maior concentração de efluente, que é uma matéria prima residual, nesta condição não houve adição de nitrato de amônio no processo. Além disso, pode-se observar que houve reprodutibilidade em todas as respostas estudadas. Os resultados mostraram que a análise conjunta das variáveis empregando planejamento de experimentos e utilizando uma faixa adequada para as variáveis de processo, proporcionaram uma melhora significativa na produção de raminose, cujo valor máximo que era de 2,64 g/L no experimento 14 do planejamento fatorial (Tabela 5.1) passou para 3,84 g/L (Tabela 5.2), o que correspondeu a um aumento de 45,5%.

5.7 - Cinética para avaliar melhor tempo de fermentação no reator, empregando condições otimizadas das variáveis concentração de efluente, nitrato de amônio e levedura cervejeira autolisada residual

O ensaio realizado no reator *B. Braun Biotech International* teve o intuito de verificar qual o melhor tempo de fermentação no reator, após otimização do processo em relação as variáveis concentração de efluente, concentração de nitrato de amônio e concentração de levedura cervejeira autolisada residual, para as respostas concentração de raminose (RM), tensão superficial (TS), índice de emulsificação (IE) e concentração final de células (X_f). A cinética foi realizada nas condições otimizadas anteriormente com a concentração inicial de *P. aeruginosa* de 1,0 ± 0,2 g/L, pH 7,0, temperatura de 30 ± 0,5°C, com a aeração de 0,5vvm e a

agitação de 550 rpm. Alíquotas de 30 mL foram retiradas para análises das respostas nos tempos: 0, 6, 10, 12, 16, 24, 36, 48 e 72 horas.

A Figura 5.50, obtida pelo *Origin Graph 8.0* mostra a cinética de fermentação em relação às respostas estudadas.

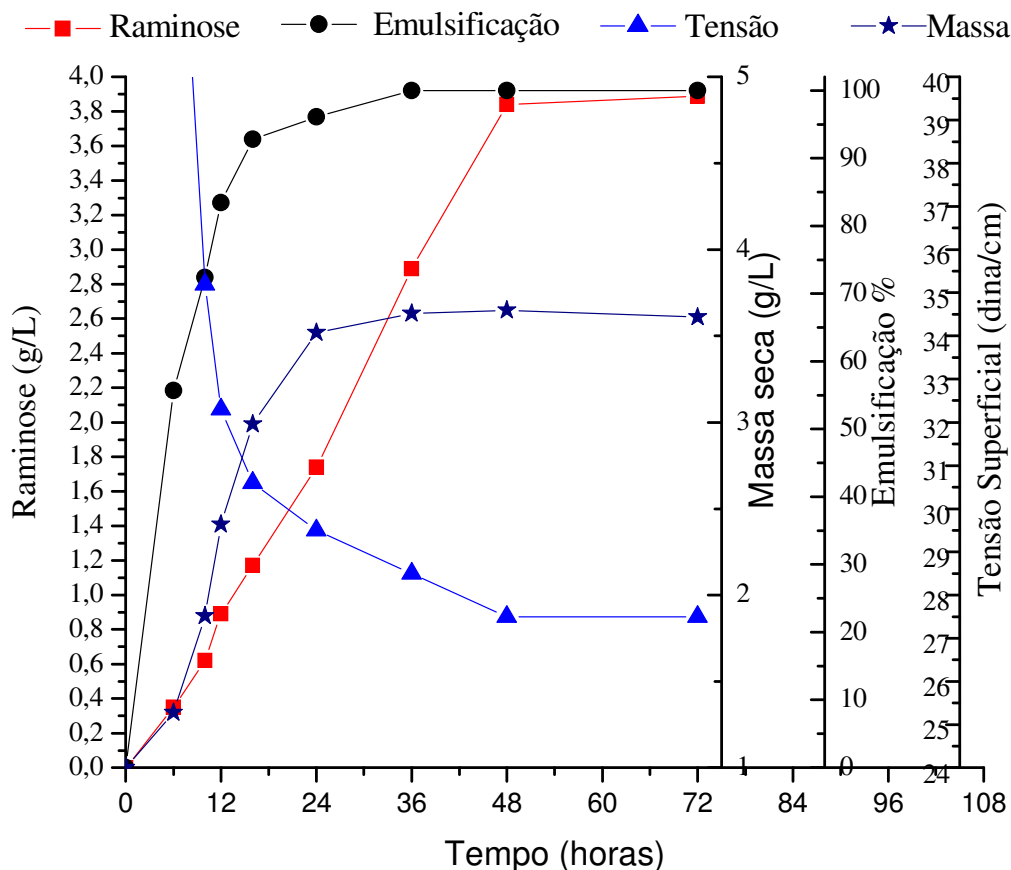


Fig. 5.50 - Evolução ao longo do tempo das concentrações raminose (■), tensão superficial (▲), índice de emulsificação (●) e massa seca (★) em relação ao tempo de fermentação. A taxa de aeração no reator foi de 0,5 vvm, agitação de 550 rpm, temperatura de $30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e volume útil de 1,5 L. Meio de cultura composto por: 60 g/L de efluente gorduroso; 15 g/L de levedura cervejeira autolisada residual; 0,2g g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 7,0 g/L de Na_2HPO_4 ; 3,0 g/L de KH_2PO_4 , sem adição de NH_4NO_3 .

Nota-se na Figura 5.50 que concentração de raminose aumenta de forma significativa nas primeiras 48 horas de fermentação, confirmando este o melhor tempo de fermentação, em que obtem-se os maiores valores para a concentração de raminose e índice de emulsificação, e o menor em tensão superficial. O crescimento celular ocorreu nas primeiras 24 horas, sendo verificado pela concentração de massa seca em g/L, porém, conforme mencionado no item 5.4, a concentração de raminose ainda continua a aumentar até 48 horas,

semelhante a produção de raminolipídeos por Oliveira *et al.* (2008). Os resultados apresentados por esse autor mostrou que a produção de biossurfactante continuava mesmo após o crescimento celular atingir o valor máximo, em fermentação utilizando *Pseudomonas alcaligenes* e óleo de palma, assim como crescimento defendido por Ramana e Karanth (1989). Este comportamento mostra que a produção do raminolipídeo foi parcialmente associada ao crescimento celular, segundo Mulligan e Gibbs (1989), pois os micro-organismos apresentaram crescimento somente até 24 horas, em que entram em regime estacionário, enquanto que ocorre aumento na concentração de raminose e índice de emulsificação.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 - Conclusões

A partir dos resultados foi possível concluir que:

- O teor de gordura de 19,48% presente no flotado industrial e a quantidade de 0,2g/L de Nitrogênio mostraram ser eficiente para a produção do biossurfactante por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*;
- Para o resíduo efluente gorduroso, a linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 apresentou-se como a mais eficiente para produzir biossurfactante em relação a ATCC 9027;
- Melhores resultados para concentração de raminose, tensão superficial e índice de emulsificação foram obtidos para concentração de efluente em 60 g/L, concentração de levedura cervejeira autolisada residual de 15 g/L, sem adição de nitrato de amônio;
- Para todas as cinéticas realizadas o melhor tempo de fermentação foi de 48 horas;
- Nas melhores condições selecionadas pela técnica de superfície de respostas para as variáveis concentração de efluente, concentração de nitrato de amônio e concentração de levedura cervejeira autolisada residual, o biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 correspondeu a 3,84 g/L de raminose, capaz de reduzir a tensão superficial do meio para 27,5 dina/cm e índice de emulsificação de 100%; em querosene de aviação.
- A produção de raminolipídeo foi parcialmente associada ao crescimento celular.
- O resíduo proveniente de flotores de abatedouros de aves e suínos se mostrou eficiente para a produção de raminolipídeo.

6.2 - Sugestões para trabalhos futuros

- Avaliar a possibilidade de utilizar o biossurfactante produzido diretamente nas estações de tratamento do efluente do próprio abatedouro;
- Avaliar metodologias simples de concentração e purificação do raminolípídeo produzido.
- Quantificar e caracterizar o raminolípídeo produzido;
- Avaliar a cinética de consumo de nutrientes do meio fermentado;
- Devido aos resultados promissores, estudar a produção deste biossurfactante empregando outros tipos de reatores, tal como reatores de fluxo ascendente com seções separadas, sendo uma com sistema de aeração central na base do mesmo e a outra para refluxo do meio fermentado.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, S.; NABI, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. Article of Bioresource Technology, jan. p.143-151, 2007.

AGUILAR, M. I.; SAEZ, J.; LLORENS, A.; SOLER, A.; ORTUÑO, J. F. Nutrient removal and sludge production in the coagulation-flocculation process. Water Research. v.36, p. 2910 – 2919, 2002.

ALMEIDA, A, Estudo cinético da produção de biossurfactante. Anais in CD-Rom XIV Congresso Brasileira de Engenharia Química, Natal, Brasil, 2002.

AMORIM, H.V., LOPES, M. L. Tecnologia sobre processamento de leveduras vivas, inativas e seus derivados: conceitos básicos. In: I Congresso Internacional sobre uso da levedura na alimentação animal. Campinas. Anais I Congresso Internacional sobre uso da levedura na alimentação animal. Campinas: CBNA, 2009, p. 5-20, 2009.

APHA (American Public Health Association); AWWA (American Water Works Association); WEF (Water Environment Federation), Standard Methods for the examination of water and wastewater; 21 ed. APHA, Washington, DC, 1998.

ARAÚJO, J. M.; GOUVEIA, E. R.; LIMA, D. P. A.; DUARTE, M dos S.; Lima, G. M. de S.. Bactérias Produtoras de Biossurfactantes: Produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de poços de petróleo. Rev. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília, Ed. 30, p.39-45, jan./jun., 2003.

BANAT, I. M.; Biosurfactants, more in demand than ever. Biofutur. V. 198, n. 20, p. 44-47, 2000.

BANAT, I. M; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I. BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential, Chem. Mater. Sci. 87 p 427–444, 2010.

BANAT, I. M. RHAMAN, K. S., RHAMAN, T.J., MARCHANT, R., MCCLEAN, S. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. Biotechnology Prog. v. 18, p. 1277-1281, 2002.

BARBOSA, M. M. C.; PAZ, M. C. de F. Produção de Biossurfactantes por *Chromobacterium violaceum* utilizando como substrato óleo vegetal. In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 2, João Pessoa, 2007. Anais ... João Pessoa, p. 1-9, 2007.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P. de; MAROSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Quím. Nova* [online]. vol.30, n.2, pp. 409-414. ISSN 0100-4042, 2007

BENINCASA, M.; ACCORSINI, R. *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as na integrated process using wastes from sunflower-oil refining as a substrate. *Bioresource Technology* 99. p. 3843-3849, 2008.

BOBBIO, A. P.; BOBBIO, F. Química do processamento de alimentos. São Paulo, ed. Varela, 151 p., 1992.

BONSUET, M. P.; WIEMOT, R. M.; MONSAN, P. F.; PAUL, F.; BOURSE, E. Enzymatic synthesis of a-butylglucoside in a biphasic butanol-water system using the a-transglucosidase from *Aspergillus niger*, in Bucke, C. (ed.), Methods in biotechnology, vol. 10 (Carbohydrate biotechnology protocols). Humana Press, Totowa. p. 291-296 , 1999.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, T. S. Statistics for Experimenters. United States of America and Canada, John Wiley & Sons, Inc., 1978.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº711 de 01 de Nov. 1995. Normas Técnicas da instalação e equipamentos para abate e industrialização de suínos. Diário Oficial da União, Brasília-DF, nº211, de 03 nov. 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº210 de 10 nov. 1998. Regulamento Técnico de inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves. Diário Oficial da União, Brasília-DF, 26 nov. 1998. Seção 1, p.226. Republicado em 05 mar. 1999, seção 1, p.17-22.

CABRAL FILHO, Sérgio Lúcio Salomon. Avaliação do resíduo de cervejaria em dietas de ruminantes através de técnicas nucleares e correlatas. Piracicaba. Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Universidade de São Paulo, 68 p., 1999.

CAMEOTRA, S. S; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactant in extreme conditions. *Microbiol Biotechnol* v.50, p.520–529, 1998.

CAVALCANTI, J. E. W. A., BRAILE, P. M., Manual de tratamento de águas residuárias industriais, 2ª edição, CETESB, São Paulo, 1993.

CECCHI, H. M. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp. Unicamp: Editora da Unicamp. Campinas-SP, p.212, 1999.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Gasi, T. M. T. Caracterização, reaproveitamento e tratamento de resíduos de frigoríficos, abatedouros e graxarias. São Paulo: CETESB, fev. 1993.

CHA, Misun; LEE, Naeun; KIM, Minju; KIM, Mia; LEE, Sangjoon. Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 in *Pseudomonas putida*. *Bioresource Tecnology*. V. 99,P. 2192-2199, 2007 .

- CIRGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Appl. Environ. Microbiol. V. 48, p. 747-750, 1984.
- CLARK, J. H.; MURPHY, M. R.; CROOKER, B. A. Supplying the protein needs of dairy cattle from by products feeds. Journal of Dairy Science, v.70, n.5, p.1092 – 1109, 1987.
- COLDEBELLA, A.; SCHEUERMANN, G. N. (coord). Relatório de projetos concluídos em 2009: EMBRAPA – CNPSA, 100p., 2009.
- COLLA, L. M.. Obtenção e Aplicação de Biossurfactantes. Rev. Vetor, Rio Grande, Ed.13, p. 85-103, 2003.
- COOPER, D. G.; CAVALERO, David A. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. Journal do Biotechnology, v. 103, p. 31-41, 2003.
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents two *Bacillus* species. Applied and environmental microbiology, v. 42 p. 224-229, 1987.
- COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E. Surface-active compounds from microorganism. Advances in Applied Microbiology, v. 26, p.229-252, 1980.
- 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, American Society for Microbiology, V. 61, n.1, p.47-64, mar. 1997.
- DJUVE, J.; YANG, X.; FJELLANGER, L. J. Chemical Destabilization of Crude Oil Based Emulsions and Asphaltene Stabilized Emulsions. Colloid and Polymer Science, v. 279, pp.232-239, 2001.
- 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. In: SINAFERM XV. Anais do Simpósio Nacional de Bioprocessos – Recife, 2005.
- FERRAZ C.; CALASANS, P. N.; CARVALHO, T. R. D. de; MARQUES, J. J.; SOUZA, R. R. Seleção de microorganismos produtores de biossurfactantes em manipueira. In: COBEQ XVIII. Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química – Foz do Iguaçu, 2010.
- FIECHTER, D. Biosurfactants: moving towards industrial application. Trends in Biotechnology, v.10, p.208-216, 1992.
- FONTES, Gizele Cardoso; AMARAL, Priscilla Filomena Fonseca; COELHO, Maria Alice. Produção de biossurfactante por levedura Quím. Nova [online]. 2008, vol.31, n.8, pp. 2091-2099.

GALLERT C.; WINTER, J. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. Journal: Naturwissenschaften. Springer, Heidelberg .V.89, n.11, p. 483-496, dez. 2002.

GÁLVEZ, A.; RAMÍREZ, M. J.; GARCIA-GARIBAY Y. M. Chemical composition of a mixture of single-cell protein obtained from *Kluyveromyces fragilis* and whey proteins. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, Caracas, v.40, n.2, p. 252-262, 1990.

GUERRA-SANTOS, L.; KAPPELI, O.; FIECHER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. Applied and Environmental Microbiology, vol. 48, n.2, p. 301-3005, 1984.

GUO-LIANG, Z., YUE-TING, W., XIN-PING, Q. "Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids". Journal of Zhejiang University Science 6B(8), pp. 725-730, 2005.

HELVACI, S. S., PEKER, S., ÖZDEMİR, G. "Effect of electrolytes on the surface behavior of rhamnolipids R1 and R2", Colloids and Surfaces B:Biointerfaces 35, pp. 225-233, 2004.

HOLMBERG, K. Natural surfactants. Rev. Current opinion in colloid & interface science, Elsevier, V. 6, n.2, p.148-159, 2001.

HOMMEL, R. K.; WEBER, L.; WEISS, L.; WEISS, A.; HIMMELREICH, U.; RIKE, O.; KLEBER, H. P. Production of sophorose lipid by *Candida Torulopsis apicola* grown on glucose. J. Biotechnol.33, 147-155, 1994.

<http://www.eurasyp.org/public.levure.autolyse.screen> Acesso em 15/01/2011

<http://www.snfbbr.com> Acesso em 10/01/2011.

JAMAL, P.; NAWAWI, W. M. F. W.; ALAM, Z. Utilization of sludge palm oil as a novel substrate for production. Bioresource Technology.v. 101, p. 0241-9247, 2010.

JARVIS, F. G., JOHNSON, M. J. "A glyco-lipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*", J. Am. Chem. Soc. 71, pp. 4121-4126, 1949.

JU, Lu-Kwang; LO, Chi-Ming. Sophorolipids-induced cellulase production in cocultures of *Hypocrea jecorina* Rut C30 and *Candida bombicola*. Enzyme and Microbial Tecnology, v. 44, p. 107-111, 2009.

JUWARKAR, A. A.; NAIR A.; DUBEY, K. V. "Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils". Chemosphere 68, pp. 1996-2002, 2007

KACHHOLTZ, T.; SCHLINGMANN Possible food and agricultural application of microbial surfactants: an assessment. In: N. Kosaric et al. Biosurfactants and Biotechnology, Marcel Dekker, New York, p. 183–210, 1987.

KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADING. Microbial production of biosurfactants and their importance. SPE Production & Facilities, v. 77, p.116-126, 1999.

KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T.. Functions na Potential Applications of Glycolipid Biosurfactants – from Energy-Saving Materials to Gene Delivery Carriers -. Journal of Bioscience and Bioengineering. v. 94, n. 3, p.187-201, 2002.

KOKAL, S. Crude. Oil Emulsions: A State-of-the-Art Review. SPE 77947, SPE Annual Technical Conference and Exhibition. 2002, San Antonio, Texas, EUA.

KOSARIC, N.; GRAY, N. C. C.; CAIRNS, W. L.; STECHEY, D.; WOOD, J. The role of nitrogen in muliorganism strategies for biosurfactant production. JAOCS, vol. 61, n. 11, 1987..

KRONEMBERGER, F. de A.. Produção de Ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em Biorreator com Oxigenação por Contactor de Membranas.Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 153 p., 2007.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). Current Opinion in Colloid & Interface Science. v.7, n.2, p. 12-20, 2002.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnose lipid – Biosynthesis, Microbial Production and Application Potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 51, p. 22-32, 1999.

LIMA, C. J; FRANÇA, F. P.; SÉRVULO, E. F. C; RESENDE, M. M.; CARSOSO, V. L. Enhancement of Rhamnolipid Production in Residual Soybean Oil by a Isolated Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Applied Bioch. And Biotechnol, p.136-140, 2007.

LIN, S. C. Biosurfactants: recent advances. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 66, p. 109-120, 1996.

MAARTENS A., SWART, P., JACOBS, E. P., An enzymatic approach to the cleaning of ultrafiltration membranes fouled in abattoir effluent, Journal of Membrane Science, v. 119, pp. 9-16, 1996.

MAIER, R.M.; CHAVEZ, G.S. *Pseudomonas aerugionsa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54, 625–633, 2009.

MANNING, F. S.; THOMPSON, R. E. Oilfield Processing, v.2: Crude oil, Penn Well Publising Company University of Tulsa, Tulsa, Oklahoma, 434 p., 1995.

MARTINS, M. dos S.. Leveduras de cerveja e cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*), autolisada e íntegra, na dieta de cães. Jaboticabal, 93p., 2009.

MILLER, R. M. Biosurfactant-facilitated Remediation of Metal-contaminated Soils. Environmental Health Perspectives, V. 103, n.1, p. 59-62, 1995.

MOREIRA, I.; MARCOS JÚNIO, M. M.; FURLAN, A. C.; PATRICIO, V. M. I.; OLIVEIRA, G. C.. Uso da levedura seca por “spray-dry” como fonte de proteína para suínos em crescimento e terminação. Revista Brasileira Zootecnia. v.31, p.962-969, 2002.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants, Trends Biotechnol. 24. p.509–515, 2006.

MULLIGAN, C. N. Environment applications for biosurfactants. Environmental Pollution, 133, p.183-198, 2004.

MULLIGAN, C. N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. Current Opinion in Colloid & Interface Science. v.14, p. 372-378, 2009.

MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. Biosurfactant production by a chloramphenicol tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Biotechnology, v. 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 radioresistens*, Applied and Environmental Microbiology, v. 61, n. 9, p 3240-3244, 1995.

NAWAWI, W. M. F. W; JAMAL, P.; ALAM, M. Z. Utilization of sludge palm oil as a novel substrate for biosurfactant production. Bioresource Technology., 101, 9241-9247, 2010

NITSCHKE M.; PASTORE G. M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. Revista Química Nova, V. 25, n.5, p.772-776, mar. 2002.

NOGHABI, K. A.; LOFABAD, T. B.; ABASSI, H.; AHMADKHANIHA, R.; ROOSTAAZAD, REZA; MASOOMI, F.; ZAHIRI, H. S.; AHMADIAN, G.; VALI, H. Structural characterization of a rhamnolipid-type biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* MR01: Enhancement of di-rhamnolipid proportion using gamma irradiation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. v. 81, p. 397-405, 2010.

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.

OLIVEIRA, D. A. G. de. Uso do autolisado de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e do concentrado protéico do soro de leite bovino como ingredientes na recuperação de ratos submetidos à restrição protéica ou restrição alimentar. Campinas, Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de engenharia de alimentos, 2003, 84p.

OLIVEIRA, F. J. S.; VASQUEZ, L.; CAMPOS, N. P. de; FRANÇA, F. P. de. Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain. Process Biochemistry, v. 44, p. 383-389, 2008.

OPLUSTIL, C.P.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R.; SINTO, S. I. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. São Paulo: Sarvier, 2000. 254 p

PACHECO. J. W. Guia técnico ambiental de abates (bovino e suíno). São Paulo: CETESB, 98p. (1CD): il.; 21 cm. – (Série P+L), 2006a.

PACHECO. J. W. Guia técnico ambiental de graxarias. São Paulo: CETESB, 76p. (1CD): il.; 21 cm. – (Série P+L), 2006b.

PACHECO. José Wagner; YAMANAKA, Hélio Tadashi. Guia técnico ambiental de abates (bovino e suíno). São Paulo: CETESB, 2006. 98p. (1CD): il.; 21 cm. – (Série P+L)

PAKSHIRAJAN, K.; DAVEREY, A. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. Food Research International, v. 42, p. 499-504, 2009.

PATTANATHU, K. S. M. R; EDWARD, G. Production, characterization an applications of biosurfactants – Rewiew Asian Network for Scientific Information, v. 7, n.2, p. 360-370, 2008.

PHIPPS, R. H.; SUTTON, J. D.; JONES, B. A. Forage mixtures for dairy cows: the effect on dry-matter intake and milk production of incorporating either fermented or urea-treated whole-crop wheat, brewer's grain, fodder beet or maize silage into diets based on grass silage. Animal Science, v.61, p.491-496, 1995.

PINTO, M. H.; MARTINS, R. G. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. Quím. Nova [online], vol.32, n.8, pp. 2104-2108, 2009.

PIRÔLLO, M. P. S. Estudo da Produção de Biossurfactantes utilizando Hidrocarbonetos. Rio Claro. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 61 p., 2006.

PORNSUNTHORNTAWAEE, O.; CHAVEDEJ, S.; RUJIRAVANIT, R. Solution properties and vesicle formation of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 72, p. 6-15, 2009.

RAHMAN, 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 Tecnology, n.81, p. 25-32, 2002.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; KOURKOUTAS, Y. “Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients”, Bioresource Technology 90, pp.159-168, 2003.

RAJESHWARI, K. V.; BALAKRISHNAN, M.; KANSAL, A.; LATA, K.; KISHORE, V. V. N., State of the art of anaerobic digestion technology for industry wastewater treatment, Renewable & Sustainable Energy Reviews, v.4, pp. 135-15., 2000.

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.

REIS, F. A. S. L.; SERVULO, E. F. C; FRANÇA, F. P. Lipopetide surfacant production by *Bacillus subtilis* grown on low-cost raw materials. Applied Biochemistry and Biotechbology, 115, 899-912, 2004.

REIS, R. S.; ROCHA, S. L. G.; CHAPEAUROUGE, D. A.; DOMONT, G. B.; ANNA, L. M. M. S.; FREIRE, D. M. G.Effects of carbon and nitrogen sources on the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* PA1 during rhamnolipid production. Process Biochemistry. v.45, p. 1504-1510, 2010.

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.

REVISTA ALCOOBRAS. Vaca louca abre Mercado de leveduras. São Paulo, n. 69, set/out. 2001.

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* 44 T1. *Biotechnology Letters*, v. 1, n. 2, p. 871-874, 1989.

RODRIGUES, Maria Isabel; IEMMA, Antônio Francisco. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos. 1ª.Ed. Campinas-SP: Casa do Pão Editora, 2005.

RODRIGUES, L.; MOLDES, A.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. *Biochem. Eng. J.* 28, 109–214, 2006.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. In: *Current Opinion in Biotechnology*. Ed. Elsevier, v. 13, p. 249-252, 2002.

ROSEN, M.J. Surfactants and Interfacial Phenomena, third ed. John Wiley and Sons, Inc., New Jersey, 2004.

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 aeruginosa* PA 1, Applied Biochem. and Biotechnol. p. 90-93, 2001.

SANTA ANNA, L. M. M.; SORIANO, A. U.; GOMES, A. C. Use of biosurfactant in the removal of oil from contaminated sandy soil, Journal of Chemical Technology & Biotechnology, V. 82, n.7, p. 687-691, 2007.

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 rhamnolipids by a strain *Pseudomonas aeruginosa*. Applied Bioch. And Biotechnol, V. 98-100, p.1025-1035, 2002.

SANTOS, G. D. Perspectivas brasileira e mundial da produção de leveduras. In: I Congresso Internacional sobre Uso da Levedura na Alimentação Animal, 2009, Campinas. Anais I Congresso Internacional sobre Uso da Levedura na Alimentação Animal, Campinas: CBNA, p.1-4, 2009.

SARACHAT, T.; PORNSUNTHORNTAWEE, O.; CHAVADEJ, S. Purification and concentration of a rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using foam fractionation. Bioresource Technology, ago. p.324-330, 2009.

SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradação, modificações. São Paulo: Varela, p.116, 1996.

SGARBIERI, V. C.; OLIVEIRA, D. A. G.; SANTUCCI, M. C.; SCHIMIT, F.; FARIA, E. V.; ROSA, L. L.; CHAUD, S. G. Desenvolvimento de tecnologia visando o aproveitamento de levedura em alimentação humana e animal. Campinas: FAPESP / ITAL, 130 p. (Relatório Inovação Tecnológica 98/4173-5), 2002.

SHAW, D. J. Introduction to Colloid and Surface Chemistry, 4 ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 306 p., 1991.

SHIN, J. D.; LEE, J.; KIM, Y. B.; HAN, I.; KIM, E. Production and characterization of methyl ester sophorolipids with 22-carbon-fatty acids. Bioresource Technology. v. 101, p. 3170-374, 2010.

SILVA, W. T. P. da; GOMES, L. A.; SANTOS, A. de A.. Aplicação da capacidade de flotação de uma ETE de uma indústria frigorífica, usando tratamento físico-químico. 24º Congresso Brasileiro de Engenharia Ambiental – ABES, 2007.

SOLANAS, A. M.; ABALOS, A.; VIÑAS, M.; SABATÉ, J.; MANRESA, M. A. Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. Biodegradation 15. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. p. 249-260, 2004.

STIPCEVIC, T.; PILJAC, A.; PILJAC, G. “Enhanced healing of full-thickness burn wounds using di-rhamnolipid”, Burns 32, pp. 24-34, 2006.

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. 46, p. 51-60, 1985.

TULEVA, B.K.; IVANOV, G.R.; CHRISTOVA, N.E. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. Z. Naturforsch., v. 57c, p. 356-360, 2002.

VILAS BOAS, E. V. de B.; LIMA, L. C. de O.; BRESSAN, M. C.; BARCELOS, M. de F. P.; PEREIRA, R. G. F. A. Manejo de resíduos da agroindústria. Lavras: Gráfica Universitária UFLA/FAEPE, 2001.

VOLLBRECHT, E. Production na structure elucidation of di and oligosaccharide lipids (biosurfactant) from *Tsukamurella sp.* Applied Microbiology and Biotechnology, v. 50, p. 530-537, 1998.

WEI, Y.; CHOU, C.; CHANG, J. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. Biochemical Engineering Journal 27, p. 146-154, 2005.

WEI, Y.; CHENG, C.; CHIEN, C.; WAN, H. Enhanced di-rhamnolipid production with an indigenous isolate *Pseudomonas aeruginosa* J16. Process Biochemistry, v. 43, p. 769-774, 2008.

WEST, J. W.; ELY, L. O.; MARTIN, S. A. Wet brewers grain for lactic acid during hot, humid weather. Journal of Dairy Science. v.77, p.196-204, 1994.

WU, J.-Y.; YE H K-L; LU W-B; LIN C-L; CHANG J-S. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site, Article of Bioresource Technology, fev. p. 1157-1164, 2007.

YAHYA, A. R.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG Esther synthesis in lipase-catalyzed reactions. Enzyme Microb. Technol., New York, v. 23, p. 438-450, 1999.

YAN, Y.; BORNSCBEUER, U. T.; SADLER, G.; LUTZ-WALK, S.; OTTO, R. T.; REUSS, M.; SCHMID, R. D. Regioselective lipase-catalyzed synthesis of glucose ester on a preparativescale. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 103,583-587, 2001.

YIN, H.; QIANG, J.; JIA, Y.; YE, J.; PENG, H.; QIN, H., ZHANG, N.; HE, B. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater, Article of Process Biochemistry, nov. p.302-308, 2008.

ZAJIC, J. E., SEFFENS, W. In: CRC Critical Reviews in Biotechnology, Biosurfactants, v.1, n.2, 1984.

ZANOTTO, D. L.; BELLAVER, C.; COLDEBELLA, A.; SCHEUERMANN, G. N.; CUNHA JUNIOR, A.; AJALA, L. C. Flotado de Efluentes de Frigorífico de Suínos e Aves – 1. Composição Química. Concórdia-SC: EMBRAPA-CNPISA. 3p. (EMBRAPA-CNPISA. Comunicado Técnico, 440), 2006.

CAPÍTULO 8

ANEXOS

ANEXO 1:

DETERMINAÇÃO DE GORDURA PELO MÉTODO DE BLIGH-DYER

Material:

Tubos de ensaio de 250 x 25 mm (capacidade aproximada de 70 mL);

Tubos de ensaio de 150 x 15 mm (capacidade aproximada de 30 mL) com tampa de rosca;

Agitador para tubos;

Centrífuga de baixa rotação;

Metanol p.a;

Clorofórmio p.a.;

Sulfato de sódio anidro;

Solução de sulfato de sódio 1% em água.

Procedimento:

Para produtos com teores de gordura acima de 20% (leite integral em pó, extrato hidrossolúvel de soja, amendoim, sementes etc.) pesar entre 2,00 e 5,00 g, e para produtos com porcentagem menor que 20%, pesar entre 3,00 e 3,50 g. É essencial que as amostras estejam moídas. Transferir as quantidades pesadas para os tubos de ensaio de 70 mL e adicionar exatamente 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água destilada, tampando hermeticamente. Os volumes de solvente que foram adicionados (10, 20 e 8 mL) correspondem a uma relação em volume de 1:2:0,8 de clorofórmio: metanol: água. Nesta proporção, os três solventes coexistem em uma solução homogênea. Quando as amostras contêm água, acima de 10%, a relação dos solventes 1:2:0,8 deve ser feita considerando a água fornecida pela amostra. Colocar os tubos no agitador rotatório por 30 minutos. Em seguida, adicionar 10 mL de clorofórmio e 10 mL da solução de sulfato de sódio 1%. Tampar e agitar por mais 2 minutos. A adição de mais clorofórmio e mais água muda a proporção para 2:2:1,8, causando a separação total do clorofórmio que carrega os lipídeos (camada inferior), portanto todos os lipídeos da amostra ficam dissolvidos em 20 mL de clorofórmio. Deixar

separar as camadas de forma natural ou centrifugar a 1000 rpm por 2 minutos, para acelerar a separação. Retirar entre 13 e 15 ml da camada inferior (clorofórmio) e colocá-los num tubo de 30 mL. Adicionar aproximadamente 1 g de sulfato de sódio anidro, tampar e agitar para remover os traços de água que invariavelmente são arrastados na pipetagem. Filtrar rapidamente num funil pequeno, usando papel de filtro, onde a solução deve ficar límpida. Medir 5 mL do filtrado e despejá-los num béquer de 50 mL, previamente pesado. Colocar béquer numa estufa a 100 °C, até evaporar o solvente. Resfriar em dessecador e pesar.

Resultados e cálculos:

Com o peso da gordura, que deve ser feita sempre em duplicata, calcular a % de lipídeos totais em 100 g de amostra, considerando as diluições feitas durante a análise.

ANEXO 2:

COLORAÇÃO DE GRAM

Material:

Culturas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas, aquecidas a 37°C / 24 h em gelose simples inclinada;

Bateria de corantes de Gram;

Lâminas;

Material para colheita;

Microscópio completo;

Óleo de imersão e xilol;

Papel de filtro;

Cubas para material usado.

Técnicas Segundo Hucker:

1. Fazer o esfregaço fino, bem espalhado, deixar secar e fixar o Marchoux;
 2. Recobrir com gotas de Gram I. Deixar 30 segundos. Escorrer e lavar com água corrente;
 3. Recobrir com gotas de Gram II. Deixar 1 minuto. Escorrer e lavar;
 4. Tratar com Gram III por 20 segundos ou até começar o reagente a sair quase incolor. Escorrer e lavar;
 5. Tratar com Gram IV por 5 segundos. Escorrer, lavar e secar.
- Observação – sob imersão.

Diagnóstico:

Células roxas: Gram-positivas;

Células vermelhas: Gram-negativas.

CAPÍTULO 9

APÊNDICES

APÊNDICE 1:

DETERMINAÇÃO DO NITROGÊNIO KJELDAHL TOTAL (MICRO KJELDAHL)

Adicionar 5 mL da amostra a ser analisada em um balão Kjeldhal de 500 mL;

Adicionar 2 g de mistura catalisadora composta de sulfato de cobre e sulfato de potássio na proporção 1:1;

Adicionar 10 mL de ácido sulfúrico concentrado;

Lavar as paredes do balão com água destilada;

Manter a mistura do balão em aquecimento até a formação de uma fumaça no interior do balão e a passagem da coloração azul para verde claro ou incolor. O tempo de digestão dura aproximadamente 2 horas, sendo que até seu início passa-se cerca de 1 hora;

Aguardar resfriamento da solução;

Colocar 300 mL de água destilada na solução;

Adicionar 30 mL de Hidróxido de sódio 60% lentamente, junto às paredes do balão, para que ocorra uma alcalinização;

Adaptar o balão ao condensador de ar do aparelho Kjeldhal;

Colocar a mangueira de saída do condensador em um erlenmeyer de 250 mL contendo previamente 25 mL de ácido bórico e 3 gotas do indicador vermelho de metila/verde de bromocresol 0,1% alcoólico;

Iniciar destilação até viragem do indicador de róseo para azul esverdeado;

Manter em aquecimento por mais 15 minutos após a viragem do indicador;

Retirar o erlenmeyer, que contém traços de Nitrogênio e desligar o aquecimento.

Proceder para a titulação: titular a solução do erlenmeyer com ácido clorídrico 0,04 N até a viragem de azul esverdeado para incolor e em excesso fica rosa.

Calcular o valor do Nitrogênio total conforme Equação 9.1.

$$\text{Nitrogênio (mg/L)} = \frac{[(V1) - (V2)] \times 560}{\text{Volume da amostra}} \quad (9.1)$$

V1: volume de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra (mL)

V2: volume de ácido clorídrico gasto na titulação do branco (mL)

APÊNDICE 2:

MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE RAMINOSE (TIOGLIÓLICO)

Adicionar 1mL da amostra a 4,5 mL de ácido sulfúrico 70% e misturar vigorosamente a solução;

Aquecer a solução a 100 °C por 20 minutos, esfriando-a até atingir temperatura ambiente;

Adicionar na mistura 0,1 mL de ácido tioglicólico 3%, preparado a fresco;

Deixar em repouso por 3 horas sob ausência de luz;

Fazer a leitura da absorbância com comprimento de onda de 420 nm no espectrofotômetro (Tabela 9.1);

Converter o valor da leitura em concentração g/L de raminose. através de uma curva-padrão previamente construída.(Figura 9.1)

Tab. 9.1 - Leitura do espectrofotômetro em relação a solução padrão de raminose para construção da curva de calibração

RMP (g/L)	Primeira leitura ABS. (420 nm)	Segunda leitura ABS. (420 nm)	Média ABS. (420 nm)
0,4	0,438	0,437	0,438
0,3	0,314	0,314	0,314
0,2	0,219	0,218	0,219
0,1	0,121	0,120	0,121
0,05	0,095	0,095	0,095
0,035	0,075	0,077	0,076
0,025	0,038	0,037	0,038

RMP - Concentração de raminose de solução padrão para construção da curva de calibração; ABS – leitura em absorbância no espectrofotômetro.

Com a Tabela 9.1 obtém-se a Curva de Calibração para concentração de raminose apresentada na Figura 9.1

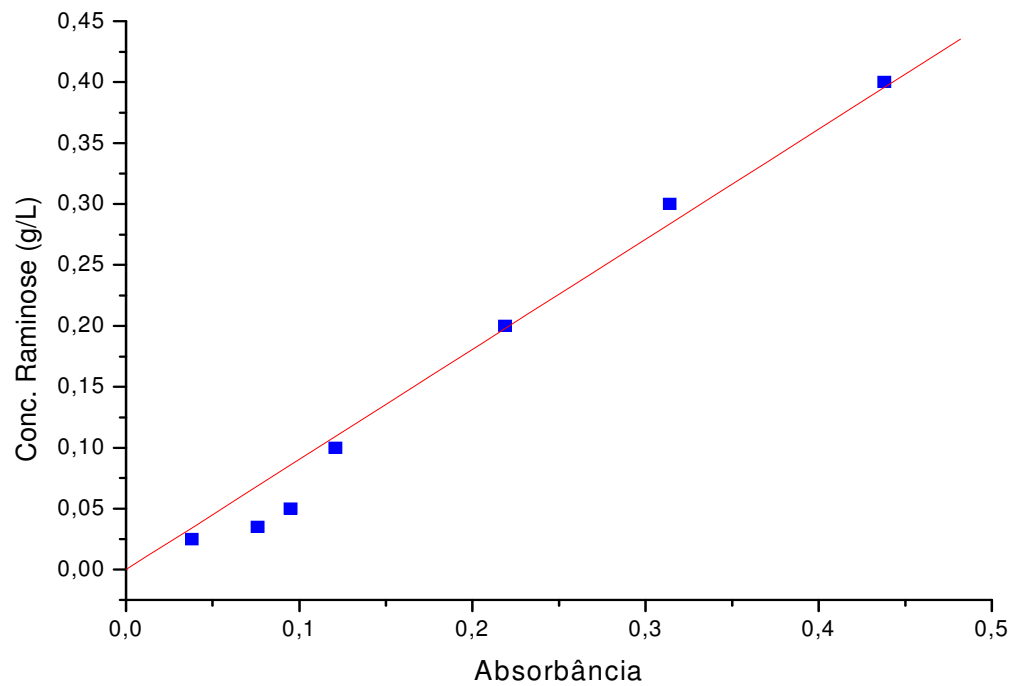


Fig. 9.1 - Curva de calibração para a concentração de raminose

Pelo gráfico apresentado na Figura 9.1, a concentração de raminose em g/L (RM) é dada pela Equação 9.2:

$$RM = 0,904 \times \text{Valor da leitura no espectrofotômetro em Absorbância} \quad (9.2)$$