

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DE
RAMNOLIPÍDIOS DE *Pseudomonas aeruginosa*

ENG. QUÍMICA CELIA FRANCISCA CENTENO DA ROSA

Prof. Dr. CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT
ORIENTADOR

Prof. Dra. SUSANA JULIANO KALIL
CO-ORIENTADORA

RIO GRANDE, MARÇO DE 2008

“Experiência é aquilo que se obtém, quando não se obtém o que se deseja.”

Dedico este trabalho aos meus pais, Adão e Zeni
e aos meus irmãos Ana e Duda.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Adão e Zeni, pelo amor, incentivo, apoio e esforços que fizeram para que eu conseguisse chegar até aqui.

Aos meus irmãos Ana e Duda, e cunhados, pelo apoio, amizade, carinho e preocupação.

Ao Marcel, pelo amor, companheirismo e paciência.

A todos os meus familiares, pela compreensão da minha ausência, em especial ao Guto e a Manu.

Ao professor André, pela orientação, confiança e amizade.

À professora Susana, pela co-orientação, amizade e otimismo.

À professora Janaína pela ajuda durante o desenvolvimento do trabalho.

À grande amiga Elisane, pela prontidão e as palavras de otimismo.

Aos meus queridos bolsistas Rosi, Julia e Mariano, pela ajuda em todos os momentos.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos pela amizade.

Ao Laboratório de Microbiologia, em especial a Ana.

Ao Laboratório de Engenharia Bioquímica pelo empréstimo de equipamentos, em especial a Martinha, Du e professor Jorge.

Aos colegas da pós pela alegria, amizade e jantinhas.

À FURG pela oportunidade de estudar gratuitamente.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos aqueles que de uma forma ou de outra colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo.....	xiv
Abstract.....	xvi
1 – Introdução.....	1
2 – Revisão Bibliográfica	4
2.1 – Biotecnologia.....	4
2.2 – Processos Fermentativos	4
2.3 – Definição de Biossurfactantes	5
2.4 – Classificação dos Biossurfactantes	6
2.5 – Aplicações dos Biossurfactantes	9
2.5.1 – Biorremediação.....	9
2.5.2 – Limpeza de Reservatórios de Óleos	9
2.5.3 – Aplicações Terapêuticas.....	10
2.5.4 – Agricultura	10
2.5.5 – Mineração.....	10
2.5.6 – Produtos de Higiene e Cosméticos	10
2.5.7 – Indústria de Alimentos	10
2.5.8 – Outras Aplicações.....	11
2.6 – Fatores que Afetam a Produção de Biossurfactantes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
2.6.1 – Fonte de Carbono	12
2.6.2 – Relação C/N	12

2.6.4 – Outros Fatores.....	13
3 – Material e Métodos	16
3.1 - Microrganismo	16
3.2 – Preparo do Inóculo	16
3.3 – Cultivo em Frascos Agitados.....	16
3.4 – Planejamento Experimental e Metodologia de Superfície de Resposta	16
3.5 – Determinação dos Parâmetros Cinéticos.....	17
3.6 – Validação dos Modelos Empíricos.....	18
3.7 - Determinações Analíticas.....	19
3.7.1 – Determinação do pH.....	19
3.7.2 - Determinação da Concentração de Ramnolipídios	19
3.7.3 - Índice de Emulsificação (IE_{24})	19
3.7.4 - Determinação de Glicerol	19
3.7.5 – Determinação da Tensão Superficial	20
3.7.6 - Determinação da Biomassa.....	20
4 – Resultados e Discussão	22
4.1 – Planejamento Experimental para Produção de Ramnolipídios	22
4.2 – Obtenção do Modelo Matemático Empírico para Concentração de Ramnolipídios.	24
4.3 – Obtenção do Modelo Matemático Empírico para o Índice de Emulsificação (IE_{24})	28
4.4 - Validação dos Modelos Matemáticos Empíricos para Concentração de Ramnose e Índice de Emulsificação (IE_{24})	33

4.4.1 – Validação do Modelo Matemático Empírico para Concentração de Ramnose.....	33
4.4.2 – Validação do Modelo Matemático Empírico para Índice de Emulsificação	37
4.5 – Parâmetros Cinéticos	38
4.5.1 – Fator de Conversão de Substrato em Produto ($Y_{P/S}$)	38
4.5.2 – Fator de Conversão de Substrato em Célula ($Y_{X/S}$)	43
4.5.3 – Fator de Conversão de Célula em Produto ($Y_{P/X}$)	44
4.6 – Tensão Superficial.....	45
5 – Conclusão.....	53
6 - Referências Bibliográficas	55
Anexos	60
Anexo 1 – Curvas de calibração.....	60
Anexo 2 – Curvas cinéticas dos ensaios de fermentação.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Diversidade de surfactantes de origem microbiana	7
Tabela 3.1 – Matriz do Planejamento Experimental 2 ³	17
Tabela 3.2 - Variáveis codificadas e reais utilizadas na validação dos modelos empíricos	18
Tabela 4.1 - Matriz do planejamento experimental e respostas obtidas para os ensaios de fermentação.	23
Tabela 4.2 - Análise de variância para a concentração de ramnolipídio.	24
Tabela 4.3 - Análise de variância para o índice de emulsificação.	29
Tabela 4.4 - Resultados obtidos na validação do modelo estatístico em 120 h.	36
Tabela 4.5 - Resultados observados e esperados para concentração de ramnolipídio.	36
Tabela 4.6 - Resultados obtidos na validação do modelo estatístico em 120 h.	37
Tabela 4.7 - Resultados observados e esperados para o índice de emulsificação.	38
Tabela 4.8 - Análise de variância para $Y_{P/S}$ em 120 h.	39
Tabela 4.9 - Medida da tensão superficial	46
Tabela 4.10 - ANOVA para a redução da tensão superficial.	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Estrutura dos quatro diferentes ramnolipídios produzidos pela <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Fonte: Tahzibi et al. (2004).....	8
Figura 4.1 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a produção de ramnolipídio em função da concentração de glicerol e da relação C/N (relação C/P = 80).....	25
Figura 4.2 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a produção de ramnolipídio em função da concentração de glicerol e da relação C/P (relação C/N = 80).....	26
Figura 4.3 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a produção de ramnolipídio em função da concentração da relação C/N e da relação C/P (Glicerol = 30).....	27
Figura 4.4 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o índice de emulsificação em função da concentração de glicerol e da relação C/N (relação C/P = 80).....	30
Figura 4.5 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o índice de emulsificação em função da concentração de glicerol e da relação C/P (relação C/N = 80).....	31
Figura 4.6 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o índice de emulsificação em função da relação C/N e da relação C/P (concentração de glicerol = 30 g/L).....	32
Figura 4.7 – Curvas cinéticas do processo fermentativo para o ensaio 1. Condições: 13,2 g/L de glicerol, relação C/N de 12,8 e relação C/P de 40.	34
Figura 4.8 – Curvas cinéticas do processo fermentativo para o ensaio 2. Condições: 13,2 g/L de glicerol, relação C/N de 40 e relação C/P de 40.	35
Figura 4.9 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o fator de conversão $Y_{P/S}$ em função da concentração de glicerol e da relação C/N (relação C/P = 80).....	40

Figura 4.10 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o fator de conversão $Y_{P/S}$ em função da concentração de glicerol e da relação C/P (relação C/N = 80).....	41
Figura 4.11 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o fator de conversão $Y_{P/S}$ em função da relação C/N e da relação C/P (concentração de glicerol = 30 g/L).....	42
Figura 4.12 - Efeito das variáveis independentes no parâmetro cinético $Y_{X/S}$. * Variável significativa a 95% de confiança ($p < 0,05$)	44
Figura 4.13 - Efeito das variáveis independentes no parâmetro cinético $Y_{P/X}$. * Variável significativa a 95% de confiança ($p < 0,05$)	45
Figura 4.15 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a redução da tensão superficial em função da concentração de glicerol e da relação C/P (relação C/N = 80).....	49
Figura 4.16 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a redução da tensão superficial em função da relação C/N e da relação C/P (concentração de glicerol = 30 g/L).....	50
Figura 1a - Curva padrão de ramnose.....	60
Figura 1b - Curva padrão de glicerol	60
Figura 1c - Curva padrão de biomassa.....	61
Figura 2a – Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 1. Condições: 20 g/L de glicerol, relação C/N de 40 e relação C/P de 40. ▶ Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.....	61
Figura 2b - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 2. Condições: 40 g/L de glicerol, relação C/N de 40 e relação C/P de 40. ▶ Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.....	62
Figura 2c - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 3. Condições: 20 g/L de glicerol, relação C/N de 120 e relação C/P de 40. ▶ Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.....	62

Figura 2d - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 4. Condições: 40 g/L de glicerol, relação C/N de 120 e relação C/P de 40.

▶ Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.....63

Figura 2e - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 5. Condições: 20 g/L de glicerol, relação C/N de 40 e relação C/P de 120.

▶ Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.....63

Figura 2f - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 6. Condições: 40 g/L de glicerol, relação C/N de 40 e relação C/P de 120.

▶ Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.....64

Figura 2g - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 7. Condições: 20 g/L de glicerol, relação C/N de 120 e relação C/P de 120.

▶ Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.....64

Figura 2h - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 8. Condições: 40 g/L de glicerol, relação C/N de 120 e relação C/P de 120.

▶ Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.....65

Figura 2i - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 9. Condições: 13,2 g/L de glicerol, relação C/N de 80 e relação C/P de 80.

▶ Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.....65

Figura 2j - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 10. Condições: 46,8 g/L de glicerol, relação C/N de 80 e relação C/P de 80.

▶ Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.....66

Figura 2l - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 11. Condições: 30 g/L de glicerol, relação C/N de 12,8 e relação C/P de 80.

▶ Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.....66

Figura 2m - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 12. Condições: 30 g/L de glicerol, relação C/N de 147,2 e relação C/P de 80.

▶ Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.....67

Figura 2n - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 13. Condições: 30 g/L de glicerol, relação C/N de 80 e relação C/P de 12,8.

▶ Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.....67

Figura 2o - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 14. Condições: 30 g/L de glicerol, relação C/N de 80 e relação C/P de 147,2.

► Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.....68

Figura 2p - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 15. Condições: 30 g/L de glicerol, relação C/N de 80 e relação C/P de 80.

► Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.....68

Figura 2q - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 16. Condições: 30 g/L de glicerol, relação C/N de 80 e relação C/P de 80.

► Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.....69

Figura 2r - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 17. Condições: 30 g/L de glicerol, relação C/N de 80 e relação C/P de 80.

► Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.....69

Resumo

A reação de transesterificação de óleos vegetais tem como produto principal o biodiesel, porém o glicerol que é subproduto desta reação pode ser transformado em resíduo devido ao aumento da produção deste biocombustível. Estudos revelam que o glicerol pode ser utilizado como substrato em processos fermentativos juntamente com microrganismos capazes de utilizá-lo como fonte de carbono. A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* demonstra capacidade de assimilação de glicerol para produção de biossurfactantes, que são moléculas produzidas por microrganismos capazes de diminuir a tensão superficial. A maior vantagem de utilização dos biossurfactantes é a aceitabilidade ambiental já que são biodegradáveis e podem ser sintetizados a partir de fontes renováveis. Atualmente a maior aplicabilidade dos biossurfactantes está focada na biorremediação de poluentes, no entanto possui várias propriedades de interesse para inúmeras aplicações na agricultura, cosméticos, produtos farmacêuticos, detergentes, processamento de alimentos e outros. A maioria dos biossurfactantes são moléculas complexas e compreendem uma grande variedade de estruturas químicas, tais como: glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, biossurfactantes poliméricos, fosfolipídios, lipídios neutros e ácidos graxos. Dentre os glicolipídios, os mais estudados são os ramnolipídios, produzidos pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar a composição do meio de produção para obtenção de ramnolipídio a partir da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* LBM10 por fermentação submersa, utilizando a técnica de planejamento experimental e análise de superfície de resposta. A cepa bacteriana, isolada de resíduos de pescado capturados na região costeira do sul do Brasil, foi utilizada para produção de ramnolipídio em meio mineral tendo o glicerol como única fonte de carbono. Foi realizado um planejamento completo central rotacional a fim de determinar a melhor condição de estudo, sendo as variáveis do planejamento a concentração de glicerol (13,2 a 46,8 g/L), a relação C/N (12,8 a 147,2) e a relação C/P (12,8 a 147,2), tendo-se como respostas a concentração de ramnolipídio, expressa como ramnose (g/L), índice de emulsificação (IE_{24} , %), redução da tensão superficial (%) e os fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), substrato em célula ($Y_{X/S}$) e célula em produto ($Y_{P/X}$). Os ensaios de fermentação foram realizados em incubadora rotatória a 30 °C e 180 rpm, por um período de 144 h. De acordo com a validação dos modelos empíricos e análise das superfícies de respostas, a condição que permite obter maior produção de ramnolipídios (2,25 g/L) associada a um alto índice de emulsificação (65 %) é a que utiliza concentração de glicerol de 13,2 g/L,

relação C/N de 12,8 e relação C/P na faixa de 40, apresentando $Y_{P/S}$ de 0,26 g/g e redução da tensão superficial de 38,33 %.

Palavras-chave: Biossurfactante, glicerol, planejamento experimental.

Abstract

The reaction of transesterification of vegetal oils has the biodiesel as main product. However, glycerol, the by-product of this reaction, can become an important feedstock with the increase in the production of this biofuel. Studies show that glycerol can be used as substrate in fermentation processes with microorganisms able to use it as carbon source. The bacteria *Pseudomonas aeruginosa* demonstrates capability of assimilation of glycerol for production of biosurfactants, which are molecules produced by microorganisms which reduce the surface tension. The most important advantage of biosurfactants is their ecological acceptance: they are biodegradable and can be produced from renewable substrates. Most work on biosurfactants applications has been focusing on bioremediation of pollutants however these microbial compounds exhibit a variety of useful properties for several applications in agriculture, cosmetics, pharmaceuticals, detergents, food processing and others. Most microbial surfactants are complex molecules, comprising a wide variety of chemical structures, such as glycolipids, lipopeptides and lipoprotein, polymeric biosurfactants, phospholipids, neutral lipids and fatty acids. Among glycolipid-type biosurfactants, rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* have been widely studied. The main objective of this work was to evaluate the culture medium for rhamnolipid production from *Pseudomonas aeruginosa* LBM10 by submerged fermentation using experimental design and surface response methodology. The strain, isolated from fish samples captured in a southern coastal zone in Brazil, was used to produce rhamnolipids using mineral media with glycerol as the only carbon source. A rotatable central composite design was used to establish the best medium composition. The parameters were: glycerol concentration (13.2 to 46.8 g/L), C/N ratio (12.8 to 147.2) and C/P ratio (12.8 to 147.2), and the responses were: rhamnolipid concentration, expressed as rhamnolipid (g/L), emulsification index (IE_{24} , %), surface tension reduction (%) and yield factors $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$ and $Y_{P/X}$. The fermentation assays were carried out in a rotary shaker at 30°C and 180 rpm by 144 h. According to validation of the empirical models and response surfaces analysis, the condition that allows to get greater production of rhamnolipids (2.25 g/L) associate to high emulsification index (65 %) is that uses glycerol concentration of 13.2 g/L, C/N ratio of 12.8 and C/P ratio of 40, showing $Y_{P/S}$ of 0.26 g/g and surface tension reduction of 38.33 %.

Keywords: Biosurfactant, glycerol, experimental design.

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

1 – Introdução

A preocupação com o aquecimento global e a escassez de petróleo fez com que pesquisadores do mundo inteiro procurassem novas alternativas para substituir os combustíveis fósseis. Com essa intenção, foi desenvolvida a tecnologia de biocombustíveis, derivados de fontes renováveis e menos poluentes que os combustíveis fósseis.

Os processos atuais de produção de biodiesel estão concentrados na reação de transesterificação de óleos vegetais, que utilizam etanol anidro como reagente e hidróxidos ou alcoóxidos de metais alcalinos como catalisadores. Tal reação gera ésteres etílicos – biodiesel – e como subproduto glicerol, que tem atualmente significativo valor econômico no mercado internacional, mas que com a produção em larga escala do biodiesel pode se transformar em resíduo (BORSCHIVER, 2006).

Alguns estudos foram ou estão sendo desenvolvidos com o intuito de propiciar um melhor destino ao glicerol, que pode ser empregado como substrato em processos fermentativos, juntamente com microrganismos capazes de utilizá-lo como fonte de carbono. A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* LBM10, isolada de resíduos de pescado capturados no extremo sul do Brasil (QUINES *et al.*, 2004) demonstrou capacidade de assimilar glicerol na produção de biossurfactante do tipo ramnolípido (PRIETO *et al.*, 2008).

Biossurfactantes podem ser definidos como bioprodutos do metabolismo de microrganismos (bactérias, bolores e leveduras) que apresentam na mesma molécula uma porção hidrofílica (ésteres, hidróxidos, fosfato, carboxilato ou carboidrato) e uma porção hidrofóbica (cadeia hidrocarbonada de um ou dois ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados). A presença destas regiões, hidrofílica e hidrofóbica, confere ao biossurfactante a propriedade de diminuir a tensão superficial e interfacial entre fases de diferentes polaridades.

A utilização dos biossurfactantes é predominantemente na indústria petroquímica, principalmente em relação à biorremediação de poluentes, entretanto, devido às suas propriedades emulsificantes, permitem inúmeras aplicações na indústria têxtil, cosmética, alimentícia e farmacêutica. Quando comparados aos surfactantes sintéticos, os biossurfactantes apresentam vantagens como biodegradabilidade, baixa toxicidade, estabilidade térmica ao pH e resistência a altas concentrações (NITSCHKE & PASTORE, 2002). Apesar de exibirem vantagens frente aos surfactantes sintéticos, os biossurfactantes não são empregados extensivamente na indústria devido aos altos custos de produção, associado a métodos ineficientes de

recuperação do produto e ao uso de substratos caros (NITSCHKE & PASTORE, 2003).

Desta forma, uma possível estratégia para a redução de custos na produção de biossurfactantes é a utilização de resíduos e subprodutos agroindustriais, como o glicerol, bem como a definição da composição do meio de produção, de forma a garantir bom rendimento e produtividade, imprescindíveis para a viabilidade de um processo. Para tal, a avaliação baseada na técnica de planejamento experimental e análise de superfície de resposta constituem uma estratégia para melhor compreensão do sistema em estudo.

Portanto, o objetivo principal do trabalho foi avaliar a composição do meio de produção do biossurfactante ramnolipídio de *Pseudomonas aeruginosa* LBM10, tendo como variáveis a concentração de glicerol e as relações C/N e C/P, verificando como estas afetam o rendimento do processo a fim de definir faixas ideais de trabalho.

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 – Revisão Bibliográfica

2.1 – Biotecnologia

A Biotecnologia é um dos ramos da ciência de grande interdisciplinaridade, tendo suas raízes na Biologia, na Química e na Engenharia, reunindo e integrando os conhecimentos e suas aplicações em diversas áreas. Esta integração, estabelecendo relações entre áreas de conhecimento, é uma das tendências da ciência moderna (REGULY, 1998).

A principal parte de um processo biotecnológico é o crescimento do microrganismo em condições ambientais que estimulem a síntese do produto que se deseja obter. Um microrganismo deve permitir elevada conversão de substrato em produto, já que até 73% do custo total de produção pode ser referente ao custo da matéria-prima. Por outro lado, é desejável que o microrganismo permita elevado acúmulo do produto no meio, sem sofrer inibição (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

2.2 – Processos Fermentativos

Os processos fermentativos são geralmente classificados quanto à condução do processo (descontínuo, semi-contínuo e contínuo), quanto ao modo de cultivo (estado sólido ou submerso) e quanto ao suprimento de oxigênio (aerados e não aerados) (REGULY, 2000). Em processos fermentativos, o meio de cultivo deve conter todos os componentes necessários em concentrações adequadas para que ocorra o crescimento e a formação do produto requerido (GOMES & KUMAR, 2005).

Nos processos descontínuos, no instante inicial a solução nutriente esterilizada no fermentador é inoculada com microrganismos e incubada, de modo a permitir que a fermentação ocorra. No decorrer do processo fermentativo nada é adicionado, exceto oxigênio, no caso de processos aeróbios, antiespumante, e ácido ou base para controle do pH. Terminada a fermentação, o meio fermentado segue para os tratamentos finais (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Nos processos semi-contínuos, uma vez colocados no reator o meio de fermentação e o inóculo, as operações que se seguem obedecem à seguinte ordem: término da fermentação, retirada de parte do meio fermentado, mantendo-se, no reator o restante do mosto fermentado e, por fim, adição de um volume de meio de fermentação igual ao volume de meio fermentado que foi retirado na etapa anterior (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Os processos de fermentação contínuos caracterizam-se por possuir uma alimentação contínua do meio de cultura a uma vazão constante, sendo o volume de reação mantido através da retirada contínua de caldo fermentado (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Quanto ao modo de cultivo de um processo fermentativo, este pode ser nos estados sólido e submerso. A fermentação em estado sólido é caracterizada pela ausência de água livre (ou de pequena quantidade de água livre) no meio de cultivo, no entanto o substrato deve possuir umidade suficiente para estimular o crescimento e o metabolismo dos microrganismos nativos de ambientes sólidos (PANDEY, 2003).

A fermentação submersa se caracteriza pela presença de água no meio de cultura, sendo amplamente empregada na produção de enzimas. Segundo Papagianni *et al.* (2001), na fermentação submersa o meio de cultura, juntamente com a cultura microbiana, está exposto a forças hidrodinâmicas, sendo bastante estudado o desenvolvimento morfológico de fungos em inúmeros processos fermentativos industriais.

Quanto à utilização de oxigênio, existem os processos fermentativos que envolvem o cultivo de células aeróbias ou aeróbias facultativas, visando à produção de antibióticos, enzimas, vitaminas, entre outros, ou ainda para a realização do tratamento biológico de águas residuárias, apresentando o aspecto comum de exigirem adequado dimensionamento do sistema de transferência de oxigênio, sem o qual esse processo dificilmente será competitivo (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

2.3 – Definição de Biossurfactantes

Os surfactantes compreendem uma classe importante de compostos químicos muito utilizados em diversos setores industriais, uma vez que atuam como dispersantes e/ou solubilizantes de compostos orgânicos. Os surfactantes possuem estrutura molecular com grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que exibem propriedades como adsorção, formação de micelas, formação de macro e micro emulsões, ação espumante ou anti-espumante, solubilidade e detergência (GOUVEIA *et al.*, 2003).

Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre as fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, reduz a tensão interfacial e superficial, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes, consistindo em subprodutos metabólicos de bactérias e fungos (bolors e leveduras), provenientes de vários substratos, incluindo açúcares, óleos, alcanos e resíduos (NITSCHKE & PASTORE, 2002; MULLIGAN, 2005).

Os biossurfactantes possuem uma estrutura comum: uma porção lipofílica usualmente composta por cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligada a uma porção hidrofílica, que pode ser um éster, um grupo hidróxido, fosfato, carboxila ou carboidrato (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Dentre as propriedades dos biossurfactantes, encontra-se a redução da tensão superficial e interfacial entre líquidos, sólidos e gases, permitindo a mistura ou a dispersão e a formação de emulsões em soluções aquosas (MORAES *et al.*, 2002). Conforme Mulligan (2005), a tensão superficial e a tensão interfacial, diminuem com o aumento da concentração do surfactante, enquanto que a solubilidade aumenta.

Nitschke & Pastore (2002) relacionam as vantagens dos biossurfactantes em relação aos surfactantes sintéticos convencionais, que são produzidos a partir de derivados de petróleo. Tais vantagens são:

- Elevada atividade superficial e interfacial, o que os torna comparáveis ou superiores aos sintéticos (detergentes aniônicos sulfatados) em termos de efetividade e eficiência;
- Maior tolerância a pH, temperatura e forças iônicas;
- Maior biodegradabilidade;
- Baixa toxicidade.

2.4 – Classificação dos Biossurfactantes

Enquanto os surfactantes sintetizados quimicamente são classificados de acordo com a natureza do seu grupo polar, os biossurfactantes são classificados, principalmente, pela sua composição química e sua origem microbiana (GAUTAM & TYAGY, 2006). A Tabela 2.1 mostra alguns biossurfactantes de origem microbiana.

Tabela 2.1 - Diversidade de surfactantes de origem microbiana

Microrganismo	Biossurfactante
<i>Bacillus licheniformis</i>	Lipopeptídio
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactina
<i>Bacillus</i> sp.	Ramnolipídio
<i>Candida bombicola</i>	Soforolipídio
<i>Candida lipolytica</i> Y – 917	Soforolipídio
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	Fosfolipídio
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ramnolipídio
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipopeptídio
<i>Rhodococcus</i> sp.	Glicolipídio

Fonte: GOUVEIA *et al.* (2003)

As principais classes de biossurfactantes incluem glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios, ácidos graxos e lipídios neutros, biossurfactantes poliméricos e biossurfactantes particulados (GAUTAM & TYAGY, 2006). A diversidade destes compostos os torna interessantes para a aplicação em diversas áreas, principalmente no controle da poluição por compostos oleosos (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

A classe mais estudada de biossurfactantes é a dos glicolipídios, que são carboidratos combinados com longas cadeias de ácidos alifáticos ou ácidos hidroxialifáticos. Dentre os glicolipídios, os mais estudados são os ramnolipídios, proveniente da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

Os ramnolipídios têm sido relatados como uma mistura de espécies homólogas composta por uma parte hidrofílica constituída de uma ou duas unidades de ramnose chamadas, respectivamente, monoramnolipídio e diramnolipídio, e por uma parte hidrofóbica formada por um ou dois ácidos graxos (SÁNCHEZ *et al.*, 2006).

A Figura 2.1 mostra as diferentes estruturas dos ramnolipídios, sendo R₁ e R₃ os principais ramnolipídios produzidos, já as estruturas R₂ e R₄ são sintetizadas apenas sob certas condições de cultivo (TAHZIBI *et al.*, 2004).

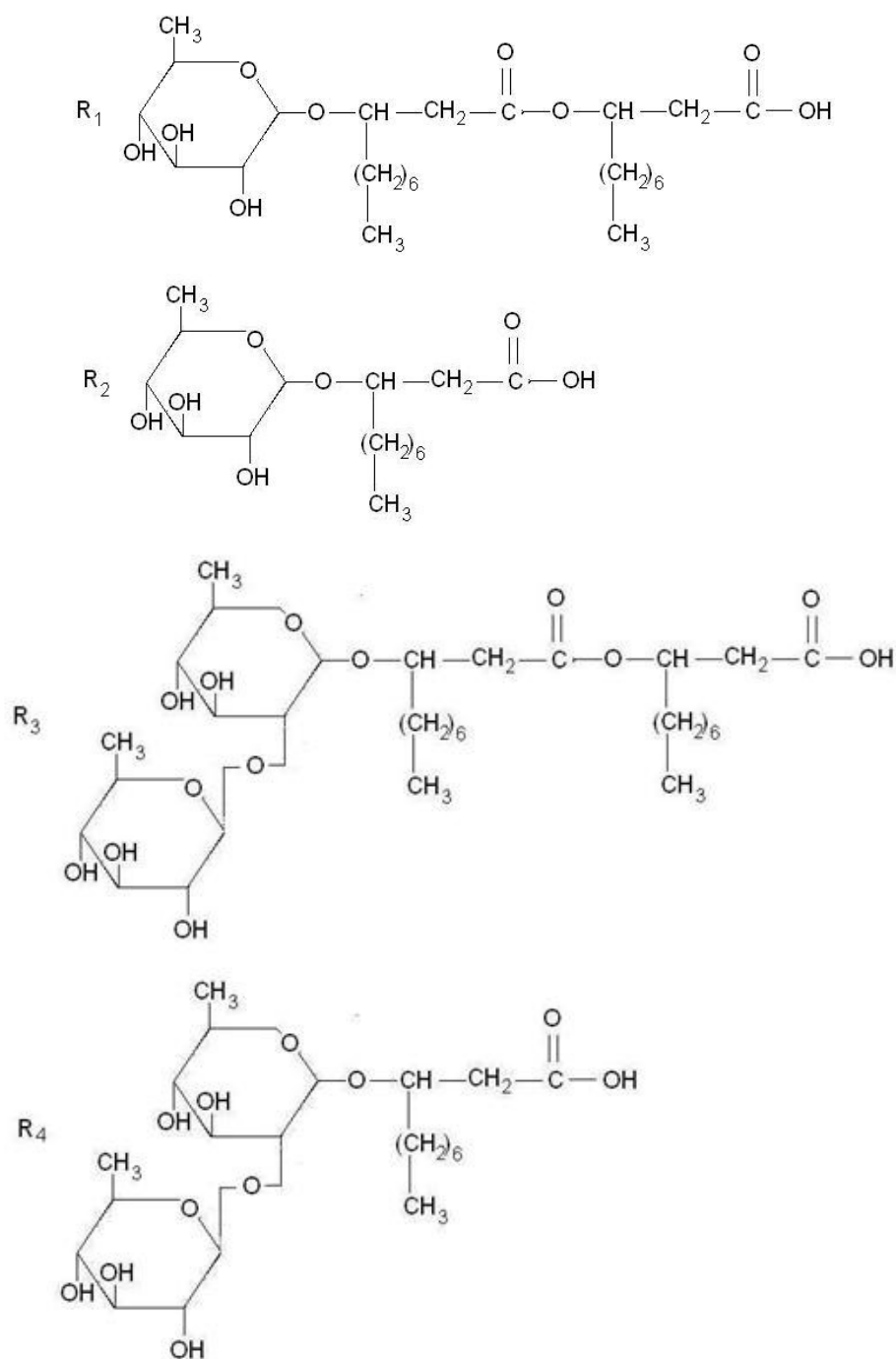


Figura 2.1 - Estrutura dos quatro diferentes ramnolipídios produzidos pela *Pseudomonas aeruginosa*. Fonte: Tahzibi *et al.* (2004).

2.5 – Aplicações dos Biossurfactantes

De acordo com Nitschke & Pastore (2002), o maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes. Outras aplicações incluem biorremediação, limpeza de reservatórios de óleos, aplicações terapêuticas, agricultura, mineração, produtos de higiene e cosméticos, indústria de alimentos, entre outros.

2.5.1 – Biorremediação

Os acidentes com derramamento de óleo se tornaram numerosos e têm causado muitos problemas ecológicos e sociais. Como os biossurfactantes aumentam as interações superficiais água/óleo, aceleram a degradação de vários óleos por microrganismos e promovem a biorremediação de águas e solos.

Os biossurfactantes podem ser usados diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo. Alternativamente, podem ser utilizados microrganismos produtores ou a adição de fatores de crescimento de microrganismos nativos capazes de produzir estes compostos.

Os biossurfactantes também são úteis na biorremediação de locais contaminados com metais pesados tóxicos como urânio, cádmio e chumbo.

2.5.2 – Limpeza de Reservatórios de Óleos

Resíduos e frações de óleos pesados que sedimentam no fundo de tanques de estocagem são altamente viscosos e podem se tornar depósitos sólidos que não são removidos através de bombeamento convencional. A remoção requer lavagem com solventes ou limpeza manual, ambas perigosas, demoradas e caras.

Um processo alternativo de limpeza é o uso de biossurfactantes que promovem a diminuição na viscosidade e a formação de emulsões óleo/água, facilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru após quebra da emulsão. Os sólidos resultantes carregam uma quantidade limitada de óleo residual pela ação detergente do biossurfactante, tornando o descarte destes resíduos menos problemático.

2.5.3 – Aplicações Terapêuticas

A surfactina, um dos mais conhecidos biossurfactantes, possui várias aplicações farmacêuticas como a inibição da formação de coágulos; formação de canais iônicos em membranas; atividade antibacteriana e antifúngica; atividade antiviral e antitumoral.

2.5.4 – Agricultura

Os biossurfactantes são usados na agricultura especialmente em formulações de herbicidas e pesticidas. Os compostos ativos destas formulações são geralmente hidrofóbicos, sendo necessários agentes emulsificantes para dispersá-los em soluções aquosas.

2.5.5 – Mineração

Compostos tensoativos produzidos por culturas de *Pseudomonas* sp. e *Alcaligenes* sp. foram utilizados para flotação e separação de calcita e eschelita. A recuperação foi de 30% e 95%, respectivamente, ressaltando que reagentes químicos convencionais são incapazes de separar estes dois minerais. Os biossurfactantes de *Candida bombicola* demonstraram eficiência na solubilização de carvão.

2.5.6 – Produtos de Higiene e Cosméticos

Devido a sua compatibilidade com a pele, os biossurfactantes podem ser usados em produtos de higiene e cosméticos. Alguns soforolipídios são utilizados como umectantes para incorporação em produtos de maquiagem e como hidratante para pele e cabelos.

2.5.7 – Indústria de Alimentos

A emulsificação tem um papel importante na formação da consistência e textura, bem como na dispersão de fase e na solubilização de aromas. Os biossurfactantes são utilizados como emulsionantes no processamento de matérias-primas. Os agentes tensoativos encontram aplicação em panificação e produtos derivados de carne, onde influenciam nas características da farinha e a emulsificação

de gorduras. Também podem ser aplicados como agentes espumantes, umectantes, e antimicrobiológicos (NITSCHKE & PASTORE, 2002; NITSCHKE & COSTA, 2007).

Além de promover a formação e a estabilização de emulsões, os surfactantes apresentam outras funções em alimentos, como por exemplo, a aumento da vida de prateleira dos produtos. Em panificação e formulação de sorvetes, aplica-se biossurfactante para controlar a consistência do produto. Também são aplicados na estabilização de gorduras durante o cozimento de óleos e graxas (NITSCHKE & COSTA, 2007).

Um dos biossurfactantes empregados na indústria de alimentos é o proveniente de *Pseudomonas aeruginosa*. Através da hidrólise do ramnolípido obtem-se L-Ramnose que é considerada um precursor de aromas, sendo de grande interesse industrial a obtenção deste bioproduto como fonte de L-Ramnose (NITSCHKE & COSTA, 2007).

2.5.8 – Outras Aplicações

Outros campos de utilização dos biossurfactantes incluem a indústria de papel, têxtil e cerâmica. O biodispersan tem aplicação na indústria de tintas, pois gera maior espalhabilidade e aumenta as propriedades de mistura. As propriedades de estabilização de espuma são necessárias na fabricação de extintores de incêndio.

2.6 – Fatores que Afetam a Produção de Biossurfactantes de *Pseudomonas aeruginosa*.

Muitos substratos podem ser utilizados na síntese de biossurfactante, dentre eles as fontes de carbono solúveis em água (glicerol, glicose e etanol), os substratos insolúveis em água (óleos vegetais e alcanos) e as fontes de nitrogênio (amônia, sais e uréia) (NGUYEN *et al.*, 2007), além de resíduos agroindustriais (BENINCASA *et al.* 2002).

Existem microrganismos que produzem biossurfactante tanto em substratos hidrofóbicos como hidrofílicos, sendo *Pseudomonas aeruginosa* e *Torulopsis bombicola* exemplos de microrganismos que possuem este comportamento (GAUTAM & TYAGY, 2006).

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* pode utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos como fonte de energia, conferindo a este microrganismo habilidade de colonizar ambientes que possuem limitação de nutrientes. Quando

submetida a condições ideais para o seu desenvolvimento, excreta o biossurfactante do tipo ramnolipídio (SÁNCHEZ *et al.*, 2007).

Em meio líquido, a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* produz, primeiramente, duas formas de ramnolipídios: ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (mono-ramnolipídio) e ramnosil-raminosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (di-ramnolipídio) (MAIER & SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000).

2.6.1 – Fonte de Carbono

A fonte de carbono afeta consideravelmente a produção de biossurfactante. Tanto as fontes solúveis em água como as insolúveis em água têm sido usadas para a produção de biossurfactante. Alguns estudos mostram que usando óleo vegetal como substrato se obtém melhores resultados de rendimento, porém pouca produção devido a baixa solubilidade do substrato, além da dificuldade de recuperação do processo pelo fato de haver resíduo de óleo no meio. Diante disso, o uso de substratos solúveis em água apresenta vantagens na produção de biossurfactante (CHEN *et al.*, 2007).

Pseudomonas aeruginosa é capaz de utilizar diferentes fontes de carbono para produção de biossurfactantes: glicerol (SANTA ANNA *et al.*, 2002; RASHEDI *et al.*, 2005), carboidratos (GUERRA SANTOS *et al.*, 1984; TAHZIBI *et al.*, 2004; RASHEDI *et al.*, 2006), hidrocarbonetos (WU & JU, 1998; SANTA ANNA *et al.*, 2002; RASHEDI *et al.*, 2005) e óleos vegetais (BENINCASA *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2006).

Pseudomonas aeruginosa LBM10, isolada a partir de amostras de resíduos de pescado capturado no sul do Brasil, foi capaz de produzir biossurfactante ramnolipídio a partir de diferentes fontes de carbono, como óleo de soja, borra de óleo de soja, óleo de pescado e glicerol, não havendo produção na presença de glicose como fonte de carbono (PRIETO *et al.*, 2008).

2.6.2 – Relação C/N

A condição nitrogênio-limitante foi considerada por diversos autores como favorável à produção de ramnolipídios. Santa Anna *et al.* (2002) e Rashedi *et al.* (2005) comentam que limitações nutricionais direcionam o metabolismo da *Pseudomonas aeruginosa* à formação do biossurfactante. Estabeleceram como melhor relação C/N, respectivamente, 60 e 55.

O nitrogênio é um nutriente essencial ao crescimento celular e à produção de ramnolipídio de *Pseudomonas aeruginosa*. Após estudos considerando diferentes

fontes de nitrogênio, Wu *et al.* (2008) concluíram que o nitrato de sódio é a fonte de nitrogênio mais eficiente na produção de ramnolipídio, alcançando uma concentração de 8,63 g/L. A assimilação de nitrato é lenta, o que simularia a condição nitrogênio-limitante, favorecendo a produção de ramnolipídios em relação a outras fontes de nitrogênio. Comportamentos semelhantes foram observados por Santa Anna *et al.* (2002) e Rashedi *et al.* (2005), em que o nitrato de sódio foi mais efetivo que sulfato de amônio e uréia.

Raza *et al.* (2007) conseguiram maior concentração de ramnolipídio (8,5 g/L em 10 dias de cultivo), proveniente de *Pseudomonas aeruginosa* EBN-8 mutante, quando utilizaram resíduo do processamento de óleo de canola (20 g/L) e relação C/N de 20, tendo nitrato de sódio como fonte de nitrogênio.

Monteiro *et al.* (2007) produziram 3,9 g/L de ramnolipídio cultivando a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614 em meio salino contendo 3% (v/v) de glicerol como única fonte de carbono e relação C/N de 55, no período de 9 dias de cultivo.

2.6.3 – Relação C/P

De acordo com Bazire *et al.* (2005), a limitação de fosfato induz a produção de ramnolipídio por *Pseudomonas aeruginosa*, porém alguns autores comentam que o aumento da relação C/P diminui a produção de biossurfactante (Guerra-Santos *et al.*, 1984; Rashedi *et al.*, 2006).

Guerra-Santos *et al.* (1984) conseguiram, aproximadamente, 6 g/L de ramnolipídio, com *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando C/P de 16, enquanto Rashedi *et al.* (2006) testaram relações C/P de 10 a 32 para produção de ramnolipídio de *Pseudomonas aeruginosa* MM1011 e verificaram que a máxima produção alcançada foi de aproximadamente 3 g/L, com uma relação C/P de 16.

2.6.4 – Outros Fatores

Além das fontes de carbono, nitrogênio e as relações C/N e C/P, existem outros fatores que influenciam na produção de biossurfactante. As condições operacionais são fatores que influenciam no desempenho da produção de ramnolipídio em fermentador. Estudos realizados por Chen *et al.* (2007), indicam que o pH e a temperatura exercem grande influência na produção de ramnolipídio de *Pseudomonas aeruginosa*, devido provavelmente ao seu efeito na fisiologia da célula bacteriana,

sendo os valores ótimos de pH e temperatura de 6,8 e 37°C, respectivamente, para a cepa estudada.

A agitação afeta a eficiência de transferência de oxigênio e a transferência de massa, sendo um parâmetro operacional importante em fermentações bacterianas (CHEN *et al.*, 2007).

CAPÍTULO III – MATERIAL E MÉTODOS

3 – Material e Métodos

3.1 - Microrganismo

A bactéria utilizada para a produção do biossurfactante foi *Pseudomonas aeruginosa* LBM10, isolada e identificada pelo Laboratório de Microbiologia da FURG, a partir de amostras de resíduos de pescado capturado na região de Rio Grande – RS (QUINES *et al.*, 2004). A cepa bacteriana foi mantida em meio TSA inclinado (Ágar Triptose de Soja) sob refrigeração.

3.2 – Preparo do Inóculo

Primeiramente foram realizadas transferências sucessivas do microrganismo, em meio TSA inclinado a fim de reativar a cultura estoque.

Como inóculo, para cada 200 mL de meio, foram utilizados quatro tubos de cultura microbiana reativada, previamente incubados a 35 °C por 48 h, em TSA, sendo raspadas com 2 mL de água peptonada 0,1% para cada tubo (PRIETO, 2007).

3.3 – Cultivo em Frascos Agitados

A suspensão bacteriana foi inoculada em 200 mL de meio, formulado conforme estabelecido pelo planejamento experimental, e incubada em incubadora rotatória sob agitação de 180 rpm e temperatura de 30 °C por 144 h. O pH inicial do meio de cultura foi ajustado para 6,5 antes da esterilização. A cada 24 h foram retiradas alíquotas de 15 mL, sendo centrifugadas a 3000 rpm por 30 min para posteriores determinações analíticas no sobrenadante (medida do pH, concentração de ramnose, índice de emulsificação, concentração de glicerol e medida da tensão superficial) e no sedimento (concentração de biomassa).

3.4 – Planejamento Experimental e Metodologia de Superfície de Resposta

A Tabela 3.1 mostra a matriz do Planejamento Completo Central Rotacional (PCCR) utilizado para avaliar a melhor composição do meio de cultura para produção de biossurfactante, totalizando 17 experimentos. O meio de produção foi composto por glicerol, NaNO₃, KH₂PO₄ (concentrações variáveis de acordo com o planejamento experimental) e MgSO₄.7H₂O (0,2 g/L), baseando-se no meio fermentativo utilizado por Rashedi *et al.* (2005).

As variáveis estudadas foram a concentração de glicerol (13,2 a 46,8 g/L), a relação C/N (12,8 a 147,2) e a relação C/P (12,8 a 147,2), tendo-se como respostas a concentração de ramnolipídio, expressa como ramnose (g/L), o índice de emulsificação (%), a redução da tensão superficial (%) e os fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), substrato em célula ($Y_{X/S}$) e célula em produto ($Y_{P/X}$), expressos em g/g.

Todas as análises foram realizadas em duplicata e os resultados obtidos avaliados estatisticamente.

Tabela 3.1 – Matriz do planejamento experimental (PCCR)

Ensaio	Glicerol (g/L)	C/N	C/P
1	-1 (20)	-1 (40)	-1 (40)
2	+1 (40)	-1 (40)	-1 (40)
3	-1 (20)	+1 (120)	-1 (40)
4	+1 (40)	+1 (120)	-1 (40)
5	-1 (20)	-1 (40)	+1 (120)
6	+1 (40)	-1 (40)	+1 (120)
7	-1 (20)	+1 (120)	+1 (120)
8	+1 (40)	+1 (120)	+1 (120)
9	-1,68 (13,2)	0 (80)	0 (80)
10	+1,68 (46,8)	0 (80)	0 (80)
11	0 (30)	-1,68 (12,8)	0 (80)
12	0 (30)	+1,68 (147,2)	0 (80)
13	0 (30)	0 (80)	-1,68 (12,8)
14	0 (30)	0 (80)	+1,68 (147,2)
15	0 (30)	0 (80)	0 (80)
16	0 (30)	0 (80)	0 (80)
17	0 (30)	0 (80)	0 (80)

3.5 – Determinação dos Parâmetros Cinéticos

A determinação dos parâmetros cinéticos $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ e $Y_{P/X}$ foi realizada a partir dos resultados experimentais, tomando por base as equações propostas por Schmidell *et al.* (2001).

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (3.1)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (3.2)$$

$$Y_{P/X} = \frac{P - P_0}{X - X_0} \quad (3.3)$$

Onde:

$Y_{X/S}$ é o fator de conversão do substrato (glicerol) em célula (g/g);

$Y_{P/S}$ é o fator de conversão de glicerol (substrato) em ramnose (produto) (g/g);

$Y_{P/X}$ é o fator de conversão de biomassa em ramnose (produto) (g/g).

X_0 é a concentração de biomassa inicial (g/L);

X é a concentração de biomassa em 120 h de processo fermentativo (g/L);

S_0 é a concentração inicial de glicerol (g/L);

S é a concentração de glicerol em 120 h de processo fermentativo;

P_0 é a concentração de ramnose inicial (g/L);

P é a concentração de ramnose em 120 h de processo fermentativo (g/L);

3.6 – Validação dos Modelos Empíricos

Dois ensaios foram propostos para validar os modelos empíricos de produção de ramnolipídios (expressos como concentração de ramnose) e índice de emulsificação (IE_{24}). Tais ensaios foram conduzidos em triplicata, sendo as análises realizadas em duplicata. A Tabela 3.2 mostra as condições testadas para validar os modelos estatísticos.

Tabela 3.2 - Variáveis codificadas e reais utilizadas na validação dos modelos empíricos

Ensaio	Níveis Codificados			Níveis Reais		
	Glicerol (g/L)	C/N	C/P	Glicerol (g/L)	C/N	C/P
1	-1,68	-1,68	-1	13,2	12,8	40
2	-1,68	-1	-1	13,2	40	40

3.7 - Determinações Analíticas

Após centrifugação do meio fermentado, foram realizadas análises em duplicata no sobrenadante e no sedimento.

3.7.1 – Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada através da leitura direta da amostra (sobrenadante) usando medidor de pH Marte – MB 10.

3.7.2 - Determinação da Concentração de Ramnolipídios

A quantificação dos ramnolipídios, expressos como ramnose (g/L), foi realizada utilizando o método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956).

Em tubo de ensaio foi adicionado 1 mL de amostra (meio fermentado livre de biomassa) previamente diluída, 1 mL de solução de fenol 5% e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Deixou-se esfriar até atingir temperatura ambiente para proceder a leitura da transmitância a 490 nm em espectrofotômetro, sendo utilizado como branco o meio não fermentado. Foi estabelecida uma curva padrão para concentrações de ramnose entre 0,02 a 0,2 g/L, apresentada no Anexo 1 (Figura 1a).

3.7.3 - Índice de Emulsificação (IE_{24})

A determinação do índice de emulsificação foi baseada na metodologia descrita por BICCA *et al.* (1999). A 2 mL de sobrenadante adicionou-se 2 mL de óleo diesel. Agitou-se em vórtex durante 2 min e deixou-se em repouso durante 24 h. O índice de emulsificação (IE_{24}) em percentual foi calculado pela medida da altura da camada emulsionada dividida pela medida da altura total da coluna líquida multiplicado por 100.

Paralelamente foi realizado um ensaio controle, constituído pelo meio não fermentado, a fim de avaliar se o próprio meio fermentativo formava emulsão.

3.7.4 - Determinação de Glicerol

O consumo de glicerol foi acompanhado através de um método enzimático colorimétrico, utilizando um *kit* para determinação de triacilgliceróis (CENTERLAB – Brasil), conforme proposto por Santa Anna *et al.* (2002). Foi estabelecida uma curva

padrão para concentrações de glicerol entre 0,1 a 0,7 g/L, apresentada no Anexo 1 (Figura 1b).

3.7.5 – Determinação da Tensão Superficial

A medida da tensão superficial do biossurfactante produzido foi determinada através da leitura direta das amostras em tensiômetro digital Krüss K9 (Krüss, Alemanha) utilizando o método do anel, que consiste em imergir totalmente um anel de platina suspenso horizontalmente, nas amostras, sendo em seguida submergido. A máxima força requerida para a retirada do anel da fase líquida é a medida da tensão superficial.

3.7.6 - Determinação da Biomassa

A determinação do crescimento microbiano foi realizada através da medida da densidade óptica a 600 nm, baseada na metodologia descrita por Wu & Ju (1998). A concentração da biomassa foi expressa em peso seco (g/L), obtida a partir de uma curva padrão previamente estabelecida, apresentada no Anexo 1 (Figura 1c).

A determinação da curva padrão de biomassa foi realizada a partir de 10 mL de meio fermentado, o qual foi centrifugado a 3000 rpm por 30 min. Após a centrifugação e descarte do sobrenadante, a biomassa foi lavada com água peptonada e novamente centrifugada nas mesmas condições. Depois da segunda centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento transferido para uma placa de Petri, previamente seca e tarada, e levado à estufa. Por diferença de massa, foi possível saber a concentração da biomassa, em g/L, na amostra.

CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 – Resultados e Discussão

4.1 – Planejamento Experimental para Produção de Ramnolipídios

Os 17 experimentos propostos no planejamento experimental, a fim de estudar o comportamento do processo fermentativo frente as variáveis concentração de glicerol, relação C/N e relação C/P, bem como os resultados experimentais obtidos e submetidos à análise estatística, são apresentados na Tabela 4.1.

É importante ressaltar que na Tabela 4.1 são apresentadas as respostas obtidas nos ensaios em 120 h de processo fermentativo. O tempo de 120 h foi utilizado para análise dos resultados por ter apresentado o melhor modelo estatístico, quando comparado aos resultados obtidos em 96 h de fermentação, em 144 h de fermentação e aos resultados máximos obtidos para cada ensaio.

As curvas cinéticas das fermentações são apresentadas em anexo (Anexo 2 – Figura 2a a Figura 2r), podendo-se observar que a síntese do biossurfactante iniciou-se em geral na fase exponencial, após 96 h de fermentação, acompanhando o crescimento celular, no entanto não foi caracterizada como cinética do crescimento associado, pois na maioria dos experimentos quantidades significativas foram acumuladas na fase estacionária. Tal comportamento foi observado por Raza *et al.* (2007) para *Pseudomonas putida*, Nitschke & Pastore (2006) para *Bacillus subtilis* LB5a e por Santa Anna *et al.* (2002) para *Pseudomonas aeruginosa* PA1. Os autores comentam que este comportamento é típico de um metabólito secundário, com incremento considerável da produção na fase estacionária e que, no caso da produção de ramnolipídios, pode estar associada ao esgotamento de nitrogênio.

Entre os ensaios realizados, o melhor experimento correspondeu ao ensaio 11 (30 g/L de glicerol, relação C/N de 12,8 e relação C/P de 80), resultando em 4,57 g/L de ramnose em 96 h de cultivo, índice de emulsificação de 68% em 72 h e redução na tensão superficial de 49,62%, sendo considerados valores bastante significativos quando comparados aos resultados obtidos com outras linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 4.1 - Matriz do planejamento experimental e respostas obtidas para os ensaios de fermentação.

Ensaio	Níveis			Ramnose (g/L)*	IE ₂₄ (%)*	RTS (%)**	Y _{X/S} (g/g)*	Y _{P/S} (g/g)*	Y _{P/X} (g/g)*
	Glicerol (g/L)	C/N	C/P						
1	-1 (20)	-1 (40)	-1 (40)	1,89	65	42,88	0,09	0,19	2,08
2	1 (40)	-1 (40)	-1 (40)	1,36	53	48,00	0,06	0,09	1,38
3	-1 (20)	+1 (120)	-1 (40)	1,20	60	46,67	0,23	0,24	1,03
4	+1 (40)	+1 (120)	-1 (40)	0,97	52	47,60	0,30	0,27	0,90
5	-1 (20)	-1 (40)	+1 (120)	1,24	62	51,86	0,14	0,15	1,05
6	+1 (40)	-1 (40)	+1 (120)	1,11	47	40,10	0,34	0,24	0,7
7	-1 (20)	+1 (120)	+1 (120)	0,94	52	46,64	0,15	0,14	0,97
8	+1 (40)	+1 (120)	+1 (120)	0,05	3	35,50	0,12	0,00	0,00
9	-1,68 (13,2)	0 (80)	0 (80)	1,43	59	53,10	0,27	0,17	0,64
10	+1,68 (46,8)	0 (80)	0 (80)	1,19	63	52,42	0,15	0,08	0,49
11	0 (30)	-1,68 (12,8)	0 (80)	3,77	61	49,62	0,18	0,17	0,94
12	0 (30)	+1,68 (147,2)	0 (80)	1,05	0	37,25	0,19	0,16	0,88
13	0 (30)	0 (80)	-1,68 (12,8)	0,58	67	52,94	0,21	0,05	0,24
14	0 (30)	0 (80)	+1,68 (147,2)	0,33	0	43,86	0,25	0,04	0,16
15	0 (30)	0 (80)	0 (80)	0,43	61	52,15	0,19	0,04	0,19
16	0 (30)	0 (80)	0 (80)	0,57	68	51,24	0,24	0,05	0,22
17	0 (30)	0 (80)	0 (80)	0,44	58	52,82	0,17	0,04	0,25

IE₂₄ = Índice de Emulsificação; RTS = Redução da Tensão Superficial; *120 h de cultivo; **144 h de cultivo.

4.2 – Obtenção do Modelo Matemático Empírico para Concentração de Ramnolipídios.

Para o tempo de 120 h foi possível a validação de um modelo matemático empírico codificado, apresentado na Equação 4.1.

$$R = 0,39 - 0,16X_1 + 0,24X_1^2 - 0,51X_2 + 0,63X_2^2 - 0,18X_3 \quad (4.1)$$

Onde:

R = concentração de ramnolipídio, expressa como concentração de ramnose (g/L);

X₁ = concentração de glicerol;

X₂ = relação C/N;

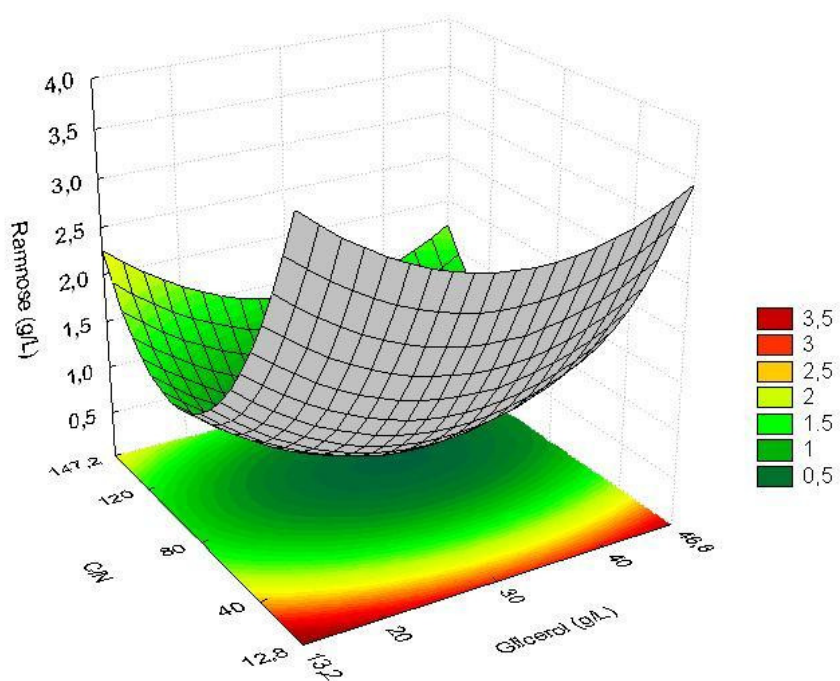
X₃ = relação C/P.

De acordo com a análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 4.2, verifica-se que o coeficiente de correlação obtido (R=0,92) e o valor de F (F_{calculado}>F_{tabelado}) validaram estatisticamente o modelo (p<0,05), permitindo a construção das superfícies de respostas, apresentadas nas Figuras 4.1, 4.2 e 4.3.

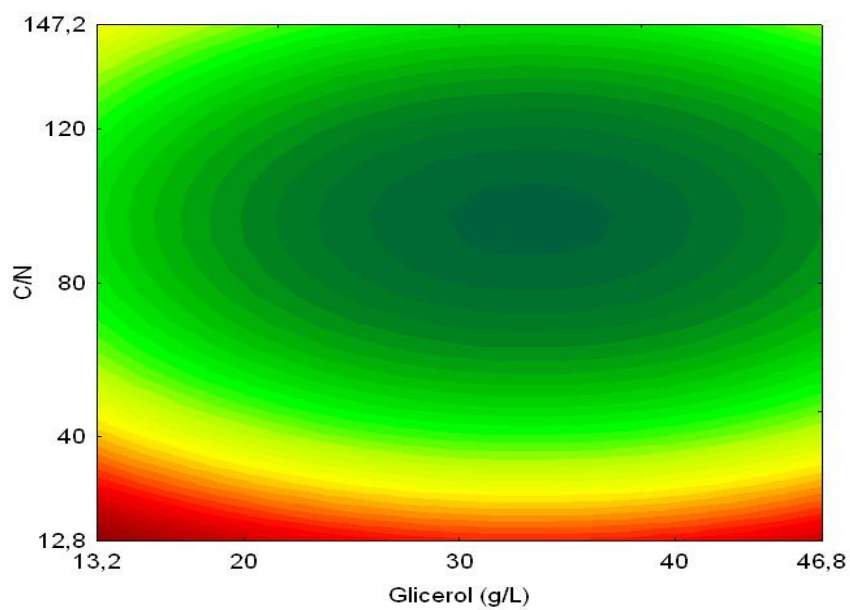
Tabela 4.2 - Análise de variância para a concentração de ramnolipídio.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calculado}
Regressão	9,44	5	1,89	12,14
Resíduo	1,71	11	0,16	
Erro Puro	0,01	2		
Falta de Ajuste	1,70	9		
Total SS	11,15	16		

F_{tabelado}= 3,20 ; Coeficiente de correlação (R) = 0,92



(a)



(b)

Figura 4.1 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a produção de ramnolípido em função da concentração de glicerol e da relação C/N (relação C/P = 80).

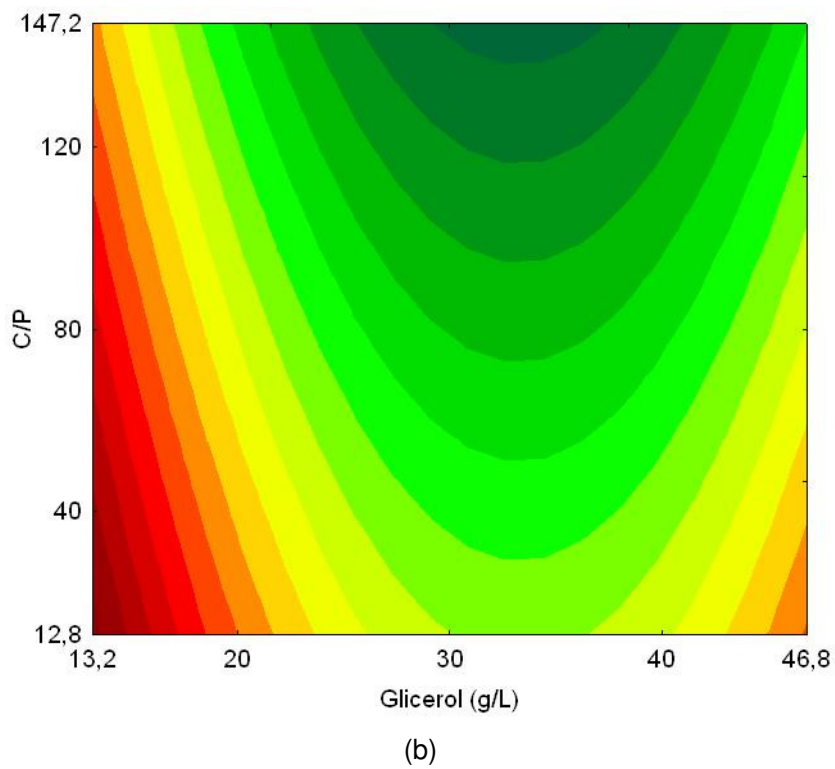
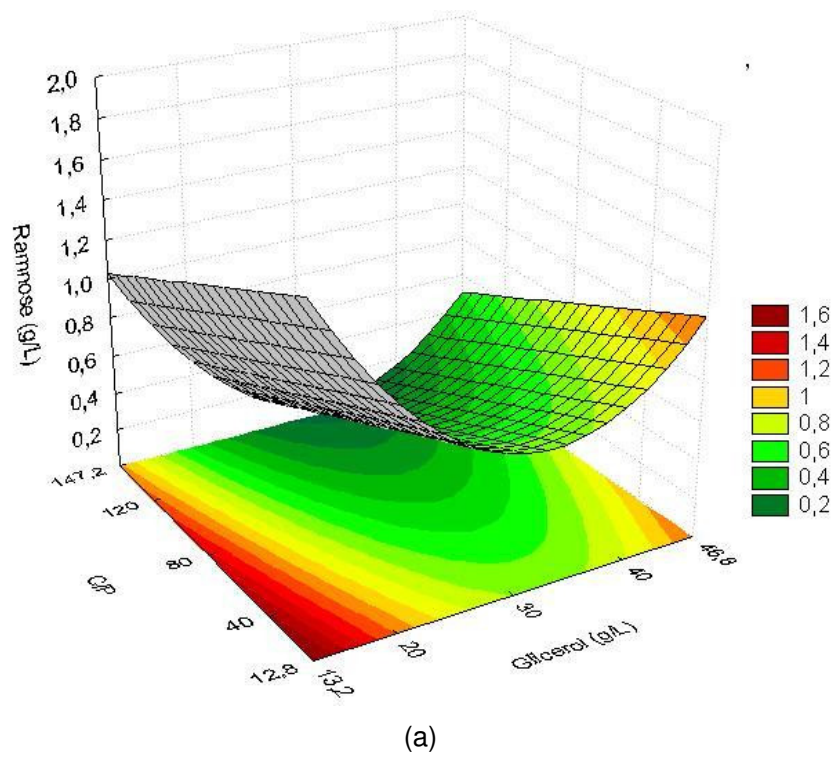


Figura 4.2 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a produção de ramnolípido em função da concentração de glicerol e da relação C/P (relação C/N = 80).

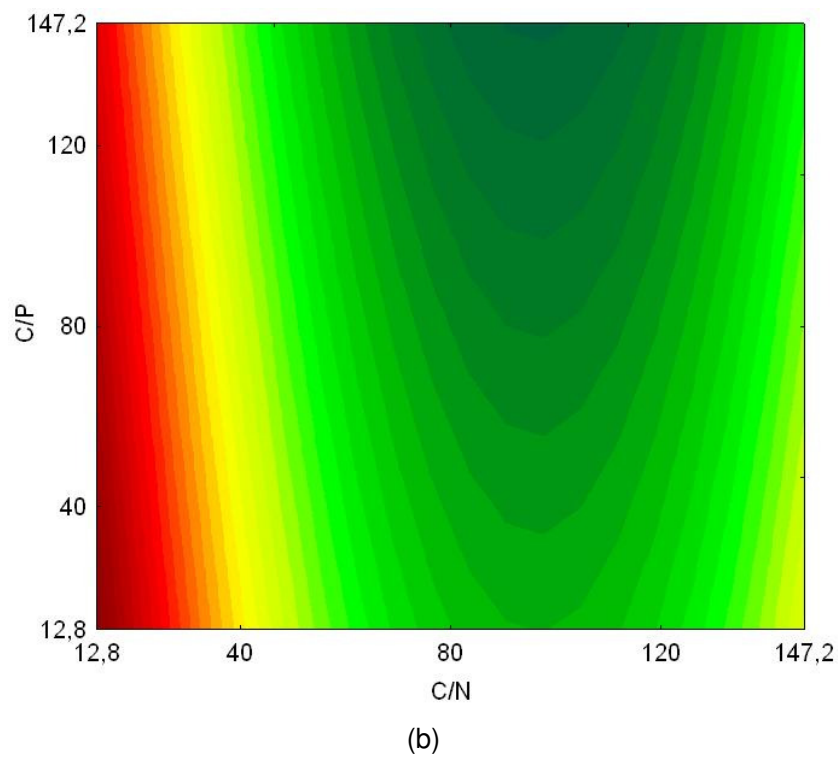
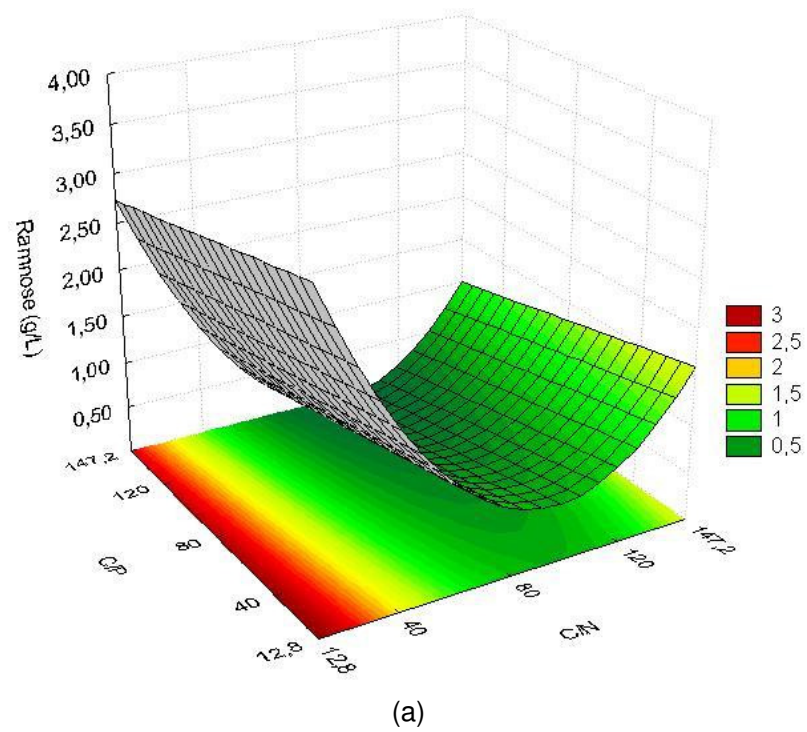


Figura 4.3 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a produção de ramnolipídio em função da concentração da relação C/N e da relação C/P (Glicerol = 30).

Na Figura 4.1 pode-se verificar que a maior concentração de ramnose foi obtida utilizando baixa relação C/N (12,8) e baixa concentração de glicerol (13,2 g/L), atingindo 3,5 g/L de ramnose. Na Figura 4.2, uma maior concentração de ramnose (1,6 g/L) pode ser observada numa baixa concentração de glicerol (13,2 g/L) e em uma relação C/P que varia de 12,8 até 40. Na Figura 4.3 observa-se 3 g/L de ramnose em uma baixa relação C/N (12,8) e numa relação C/P que varia na faixa de 12,8 até 40.

Portanto, a condição que permite a maior produção de ramnolipídio (3 a 3,5 g/L) é a que utiliza baixa concentração de glicerol (13,2 g/L), relação C/N de 12,8 e relação C/P de 12,8 até 40.

Resultados semelhantes de produção do ramnolipídio foram encontrados por Santa Anna *et al.* (2002), que utilizaram *Pseudomonas aeruginosa* PA1 e glicerol como única fonte de carbono (3% v/v), alcançando 3,16 g/L de ramnolipídio (expresso como ramnose) para uma relação C/N de 60.

O fato da concentração máxima de ramnose deste trabalho ter sido alcançada em uma relação C/N menor que a do autor citado anteriormente pode estar associado à relação C/P correspondente, de limitação de fosfato, e que influenciou na produção do biossurfactante.

Por outro lado, a relação C/N mais adequada pode estar relacionada à linhagem microbiana e ao substrato utilizado, sendo que a condição nitrogênio limitante em geral é favorável à produção de ramnolipídios, podendo ser estabelecida por uma relação C/N inicial alta ou pelo esgotamento de nitrogênio ao longo do processo fermentativo.

Situação semelhante foi encontrada por Guerra-Santos *et al.* (1984) que encontraram máxima produção de ramnolipídio por *Pseudomonas aeruginosa* utilizando condições nitrogênio limitante, (C/N de 18) e relação C/P de 16.

Guerra-Santos *et al.* (1984) e Rashedi *et al.* (2006) concluíram em seus estudos que o aumento da relação C/P diminuía a concentração do biossurfactante, sendo a máxima produção alcançada em uma relação C/P de 16.

4.3 – Obtenção do Modelo Matemático Empírico para o Índice de Emulsificação (IE₂₄)

Para o tempo de 120 h foi possível a validação de um modelo matemático empírico codificado, apresentado na Equação 4.2.

$$IE_{24} = 63,67 - 11,91X_2 - 9,74X_2^2 - 13,09X_3 - 8,68X_3^2 \quad (4.2)$$

Onde:

IE_{24} = índice de emulsificação (%);

X_2 = relação C/N;

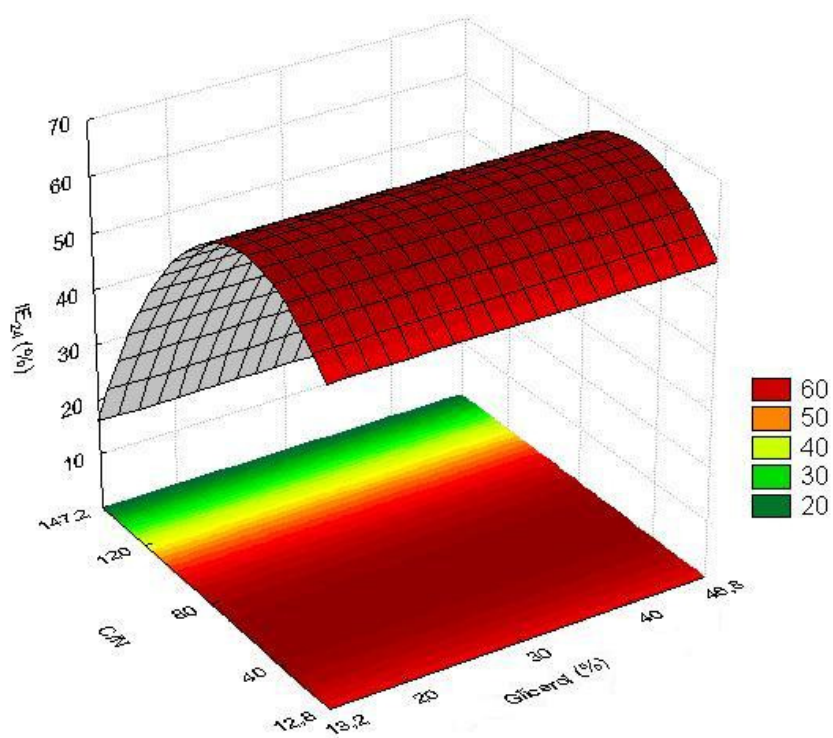
X_3 = relação C/P.

De acordo com a análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 4.3, verifica-se que o coeficiente de correlação obtido ($R=0,82$) e o valor de F ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$) validaram estatisticamente o modelo ($p < 0,05$), permitindo a construção das superfícies de respostas, apresentadas nas Figuras 4.4, 4.5 e 4.6.

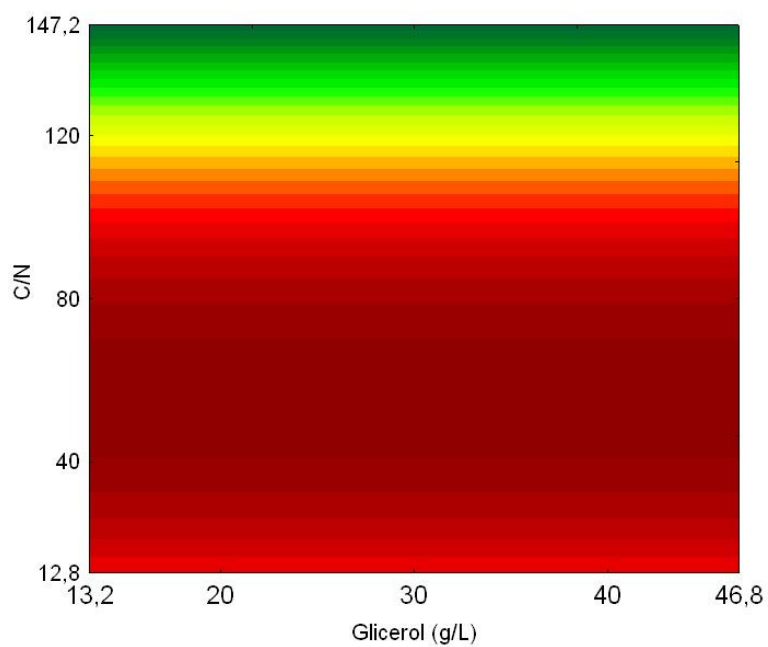
Tabela 4.3 - Análise de variância para o índice de emulsificação.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	5981,60	4	1495,40	6,25
Resíduo	2870,16	12	239,18	
Erro Puro	52,67	2		
Falta de Ajuste	2817,50	10		
Total SS	8851,77	16		

$F_{\text{tabelado}} = 3,26$; Coeficiente de correlação (R) = 0,82



(a)



(b)

Figura 4.4 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o índice de emulsificação em função da concentração de glicerol e da relação C/N (relação C/P = 80).

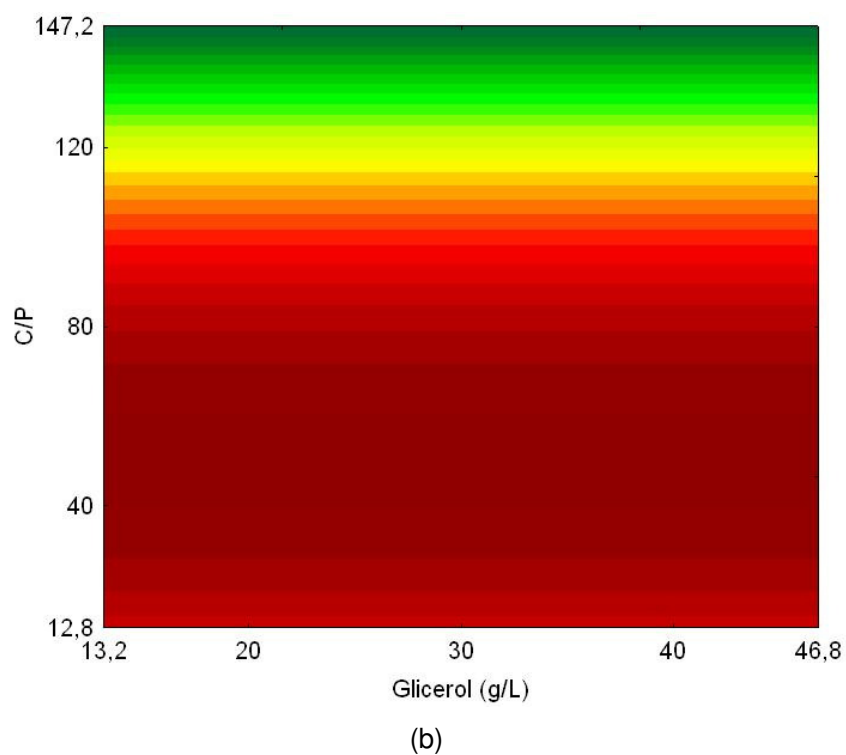
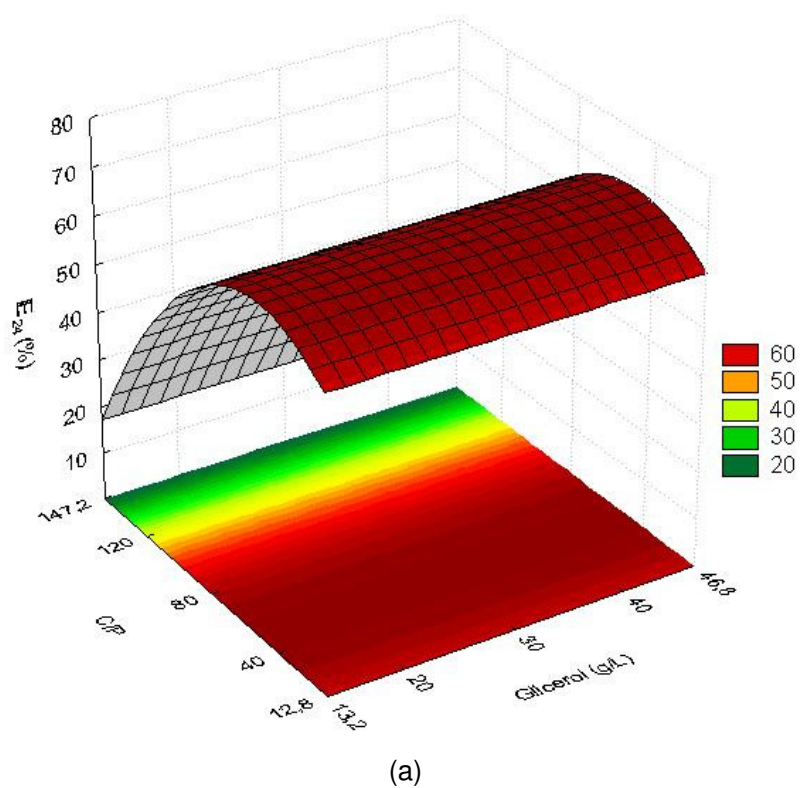
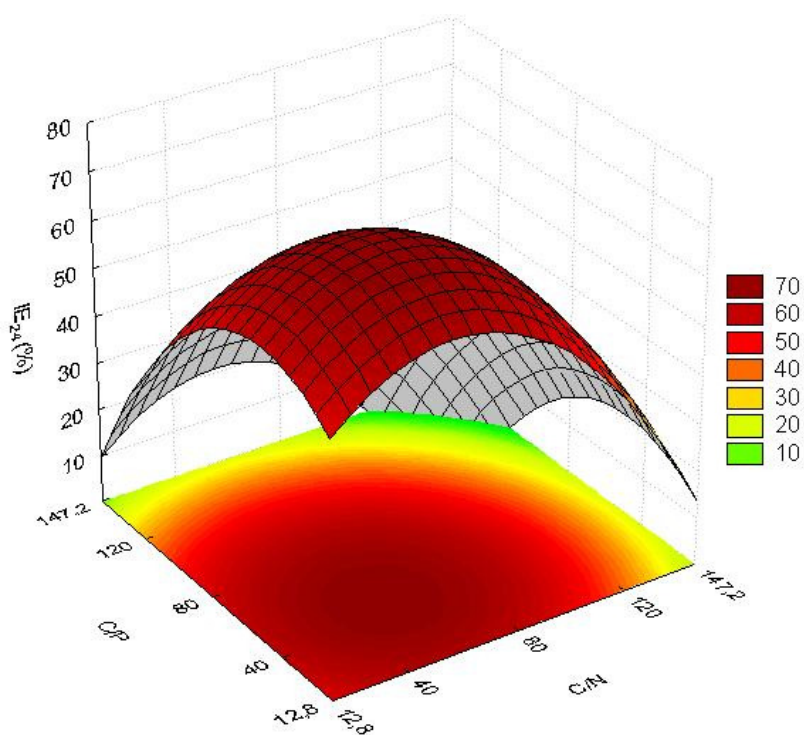
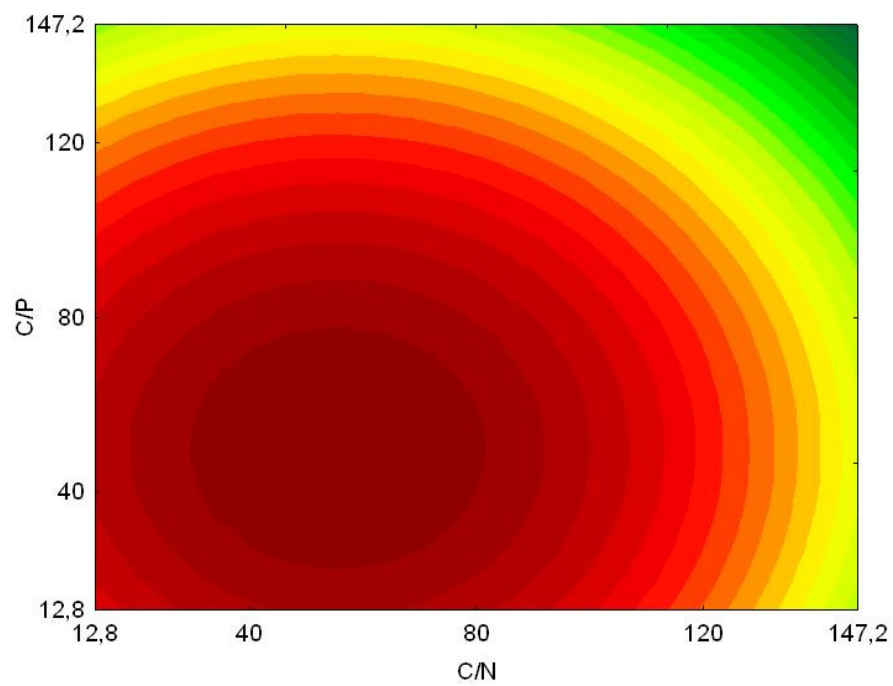


Figura 4.5 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o índice de emulsificação em função da concentração de glicerol e da relação C/P (relação C/N = 80).



(a)



(b)

Figura 4.6 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o índice de emulsificação em função da relação C/N e da relação C/P (concentração de glicerol = 30 g/L).

Na Figura 4.4 pode-se verificar que a melhor faixa de trabalho para alcançar um índice de emulsificação de 60% foi com relação C/N variando de 40 a aproximadamente 70, independente da concentração de glicerol. Na Figura 4.5 pode-se observar o mesmo índice de emulsificação obtido anteriormente em toda a faixa de concentração de glicerol estudada, com relação C/P variando de 40 até 80. Na Figura 4.6, o maior valor de índice de emulsificação obtido (60%) foi ao utilizar relação C/N de aproximadamente 35 a 80 e uma relação C/P variando na faixa de 20 a 80.

De acordo com as figuras acima, verifica-se que o glicerol não influenciou no índice de emulsificação, portanto, a melhor condição para alcançar um índice de emulsificação de 60 – 70%, visando à minimização de custos com fonte de carbono, é a que utiliza 13,2 g/L de glicerol, relação C/N de 40 e relação C/P de 40.

Resultados semelhantes foram encontrados por Abouseoud *et al.* (2008) ao testarem relações C/N de 10, 20, 30 e 50 na produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* Migula 1895-DSMZ, obtendo o melhor índice de emulsificação (65%) com a C/N de 10.

4.4 - Validação dos Modelos Matemáticos Empíricos para Concentração de Ramnose e Índice de Emulsificação (IE₂₄)

4.4.1 – Validação do Modelo Matemático Empírico para Concentração de Ramnose.

A partir dos resultados obtidos na etapa anterior, foi realizada a validação do modelo empírico para produção de ramnolipídio em duas condições distintas: condição 1 (13,2 g/L de glicerol, relação C/N de 12,8 e relação C/P de 40) e condição 2 (13,2 g/L de glicerol, relação C/N de 40 e relação C/P de 40).

As Figuras 4.7 e 4.8 apresentam as curvas cinéticas para os respectivos ensaios, que foram realizados em triplicata, mostrando o consumo de glicerol, a produção de ramnolipídio, a produção de biomassa e o índice de emulsificação.

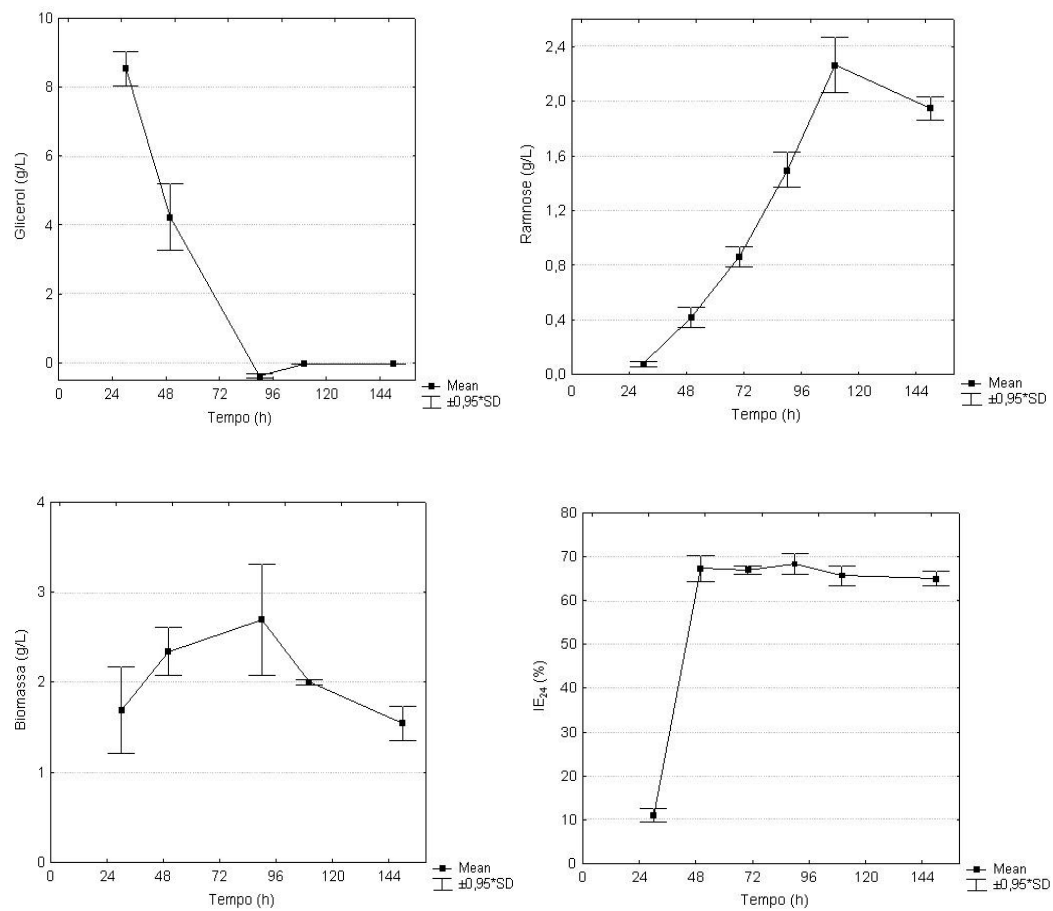


Figura 4.7 – Curvas cinéticas do processo fermentativo para o ensaio 1. Condições: 13,2 g/L de glicerol, relação C/N de 12,8 e relação C/P de 40.

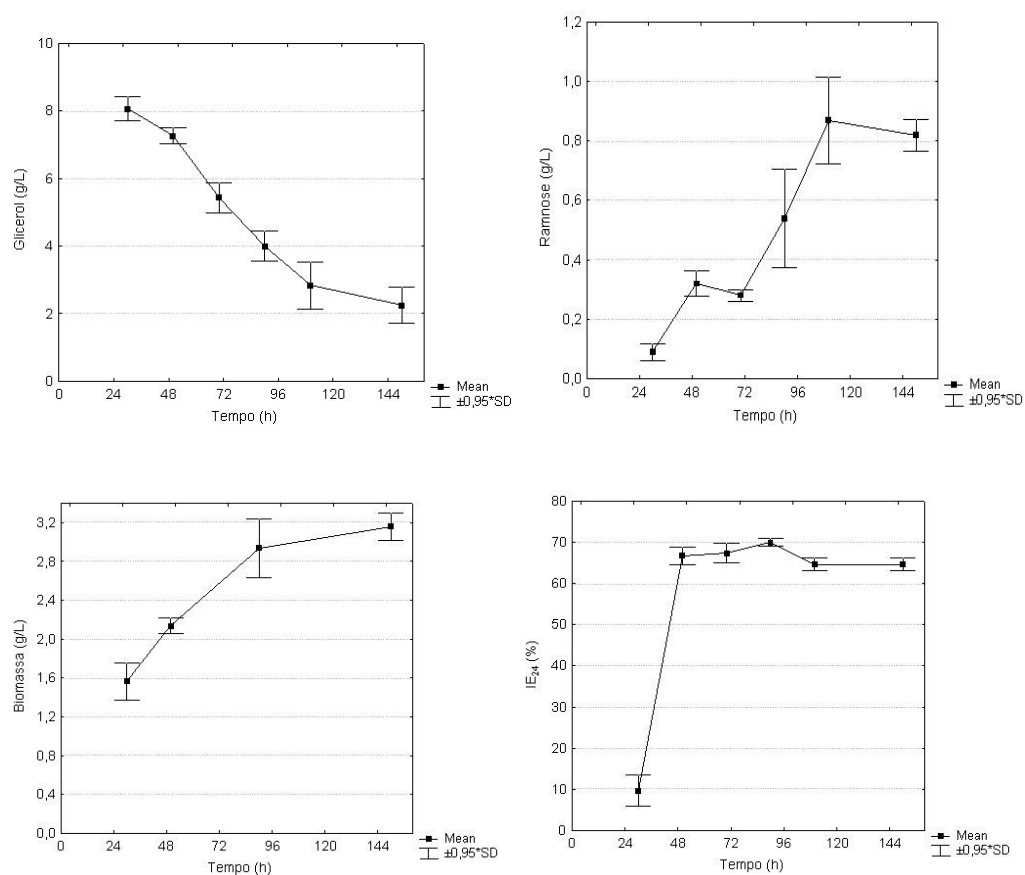


Figura 4.8 – Curvas cinéticas do processo fermentativo para o ensaio 2. Condições: 13,2 g/L de glicerol, relação C/N de 40 e relação C/P de 40.

A Tabela 4.4 apresenta os resultados encontrados para os ensaios, que foram realizados em triplicata, sendo as análises em duplicata.

Tabela 4.4 - Resultados obtidos na validação do modelo estatístico em 120 h.

Ensaio	Concentração de Ramnose (g/L)	Desvio Padrão
1	2,25	0,22
	2,06	
	2,49	
2	0,74	0,15
	1,04	
	0,83	

De acordo com a análise de variância, os resultados obtidos no ensaio 1 foram significativamente diferentes dos resultados encontrados no ensaio 2 ($p < 0,05$), com o ensaio 1 correspondendo à melhor condição para produção do biossurfactante em relação à concentração de ramnose.

A Tabela 4.5 apresenta os resultados obtidos experimentalmente e os resultados preditos de acordo com o modelo estabelecido anteriormente, para a produção de ramnolipídio.

Tabela 4.5 - Resultados observados e esperados para concentração de ramnolipídio.

Ensaio	Concentração de Ramnose (g/L)								
	Observados			Esperados			Desvio Relativo		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	2,25	2,06	2,49	4,15	4,15	4,15	-84,49	-101,51	-66,71
2	0,74	1,04	0,83	2,66	2,66	2,66	-258,94	-155,40	-220,02

Percebe-se que para ambos ensaios, a concentração de ramnose foi inferior ao esperado, já que a concentração do biossurfactante resultou em praticamente a metade da concentração esperada. Este fato pode estar associado às condições de

temperaturas não controladas, devido, provavelmente, a incubadora não ser refrigerada e as condições de temperatura ambiente, já que os ensaios foram realizados em diferentes estações climáticas.

4.4.2 – Validação do Modelo Matemático Empírico para Índice de Emulsificação

A partir dos resultados obtidos na etapa anterior, foi realizada a validação do modelo empírico para o índice de emulsificação. As condições 1 (13,2 g/L de glicerol, relação C/N de 12,8 e relação C/P de 40) e 2 (13,2 g/L de glicerol, relação C/N de 40 e relação C/P de 40) foram testadas.

As curvas cinéticas observadas para os ensaios foram mostradas anteriormente e são relativas às Figuras 4.7 e 4.8. A Tabela 4.6 apresenta os resultados encontrados para os ensaios, que foram realizados em triplicata, sendo as análises em duplicata.

Tabela 4.6 - Resultados obtidos na validação do modelo estatístico em 120 h de fermentação.

Ensaio	Índice de Emulsificação (%)	Desvio Padrão
1	67	2,3
	63	
	67	
	67	
2	65	2,0
	63	

De acordo com a análise de variância, os resultados obtidos no ensaio 1 não foram significativamente diferentes dos resultados encontrados no ensaio 2 ($p > 0,05$), embora as condições do ensaio 2 favoreçam o aumento do índice de emulsificação.

A Tabela 4.7 apresenta os resultados obtidos experimentalmente e os resultados preditos de acordo com o modelo estabelecido anteriormente para o índice de emulsificação.

Tabela 4.7 - Resultados observados e esperados para o índice de emulsificação.

Ensaio	Índice de Emulsificação (%)								
	Observados			Esperados			Desvio Relativo		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	67	63	67	70	70	70	-4,59	-11,23	-4,59
2	66	65	63	80	80	80	-20,47	-22,60	-25,83

Percebe-se que para ambos ensaios, o índice de emulsificação foi inferior ao esperado. Este fato pode estar associado às condições de temperaturas não controladas, devido, provavelmente, a incubadora não ser refrigerada e as condições de temperatura ambiente, já que os ensaios foram realizados em diferentes estações climáticas.

Portanto, verifica-se que a condição do ensaio 1 é a mais adequada para produção de biossurfactante, pois resultou em uma maior concentração de ramnose e alto índice de emulsificação, já que esta última resposta não apresenta diferença significativa entre a outra condição testada. Esta condição corresponde a 13,2 g/L de glicerol, relação C/N de 12,8 e relação C/P de 40.

4.5 – Parâmetros Cinéticos

4.5.1 – Fator de Conversão de Substrato em Produto ($Y_{P/S}$)

Para o tempo de 120 h foi possível a validação de um modelo matemático empírico codificado, apresentado na Equação 4.3. A Tabela 4.8 mostra a análise de variância para o $Y_{P/S}$.

$$Y_{P/S} = 0,04 - 0,02X_1 + 0,04X_1^2 + 0,05X_2^2 - 0,02X_3 + 0,01X_3^2 - 0,06X_2X_3 \quad (4.3)$$

Onde:

$Y_{P/S}$ = é fator de conversão de substrato em produto (g/g);

X_1 = concentração de glicerol;

X_2 = relação C/N;

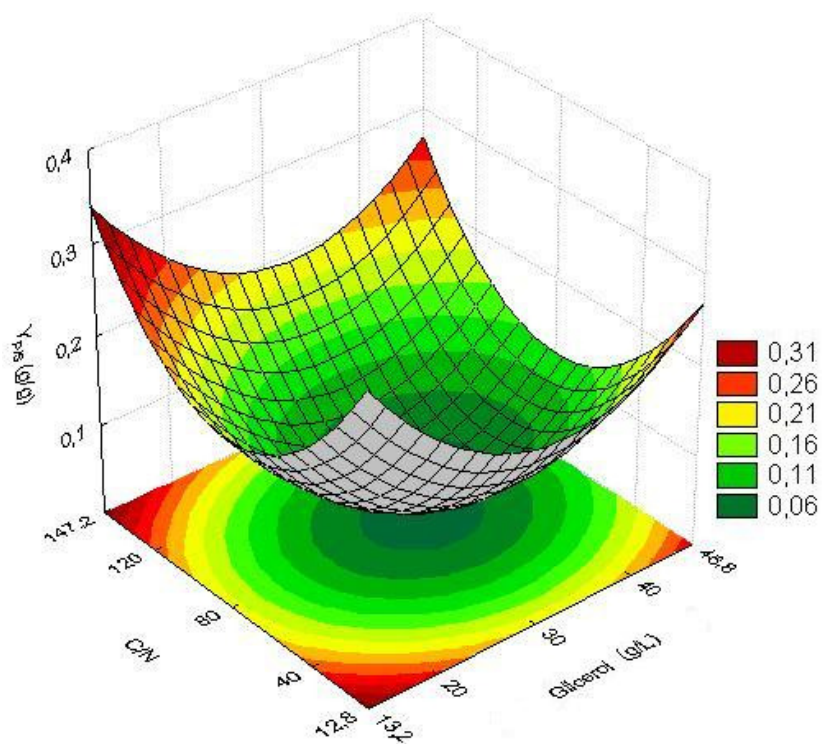
X_3 = relação C/P.

Tabela 4.8 - Análise de variância para $Y_{P/S}$ em 120 h de fermentação.

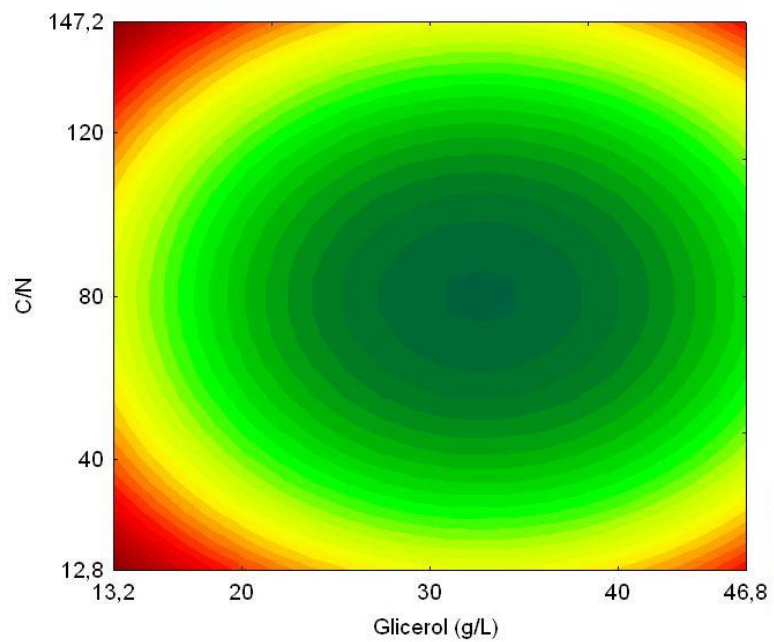
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	0,08	6	0,01	4,71
Resíduo	0,03	10	0,00	
Erro Puro	0,000141	2		
Falta de Ajuste	0,03	8		
Total SS	0,110460	16		

$F_{\text{tabelado a 95\%}} = 3,22$; Coeficiente de correlação (R) = 0,84

Pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 4.8, verifica-se que o coeficiente de correlação obtido ($R=0,84$) e o valor de F ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$) validam estatisticamente o modelo empírico do $Y_{P/S}$ ($p < 0,05$), permitindo a construção das superfícies de respostas, apresentadas nas Figuras 4.9, 4.10 e 4.11.

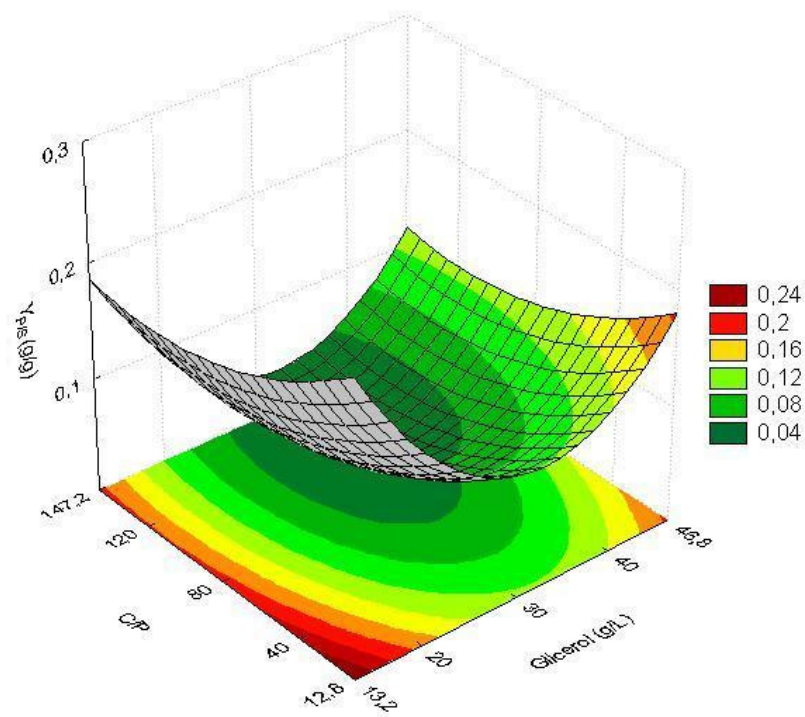


(a)

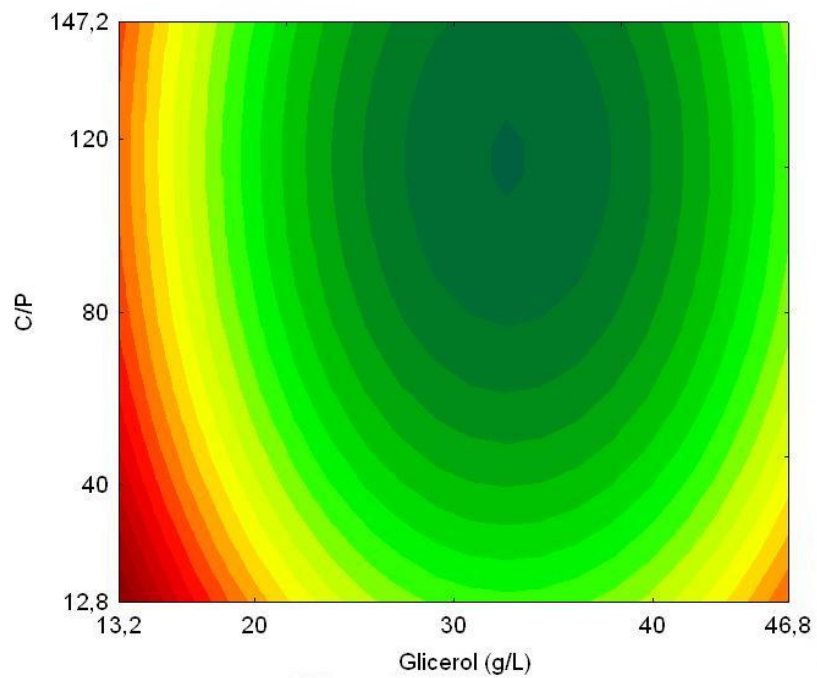


(b)

Figura 4.9 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o fator de conversão $Y_{P/S}$ em função da concentração de glicerol e da relação C/N (relação C/P = 80).



(a)



(b)

Figura 4.10 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o fator de conversão $Y_{P/S}$ em função da concentração de glicerol e da relação C/P (relação C/N = 80).

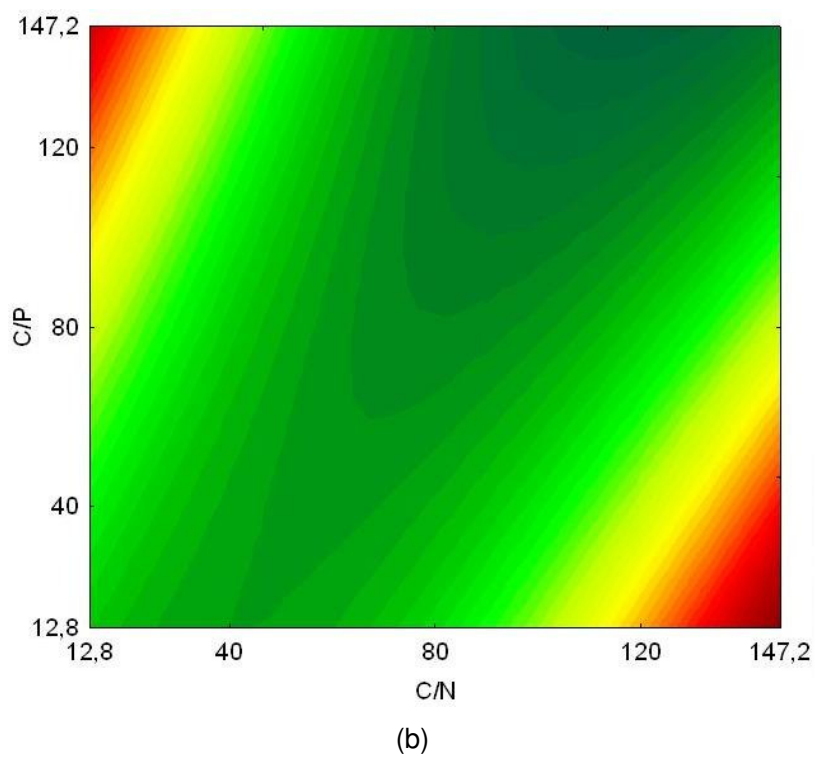
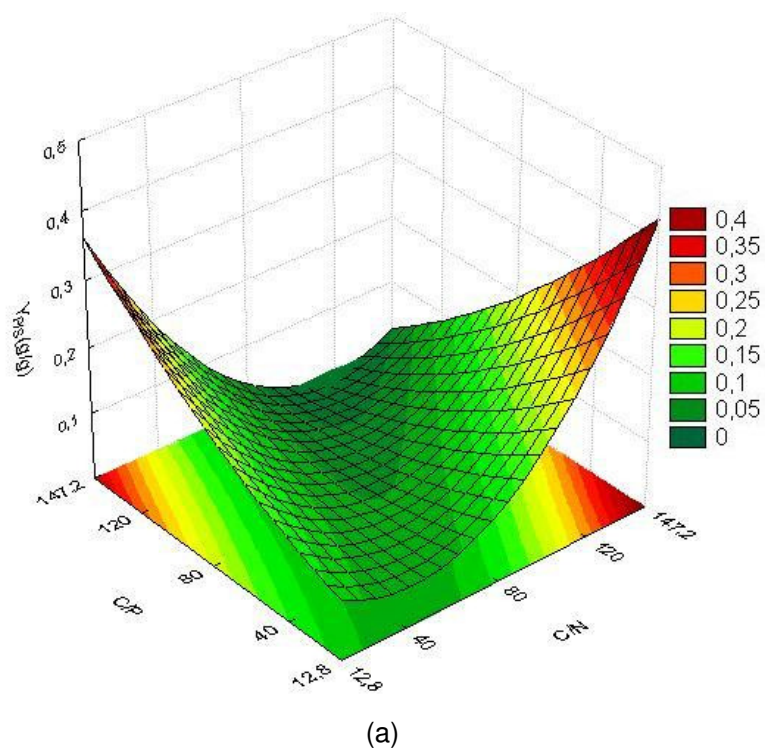


Figura 4.11 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o fator de conversão $Y_{P/S}$ em função da relação C/N e da relação C/P (concentração de glicerol = 30 g/L).

Na Figura 4.9 pode-se verificar que foi obtido maior $Y_{P/S}$ (0,31 g/g) utilizando 13,2 g/L de glicerol e nas condições de relação C/N que podem ser de 12,8 ou de 147,2. Na Figura 4.10 obteve-se maior $Y_{P/S}$ (0,24 g/g) ao utilizar baixas concentrações de glicerol (13,2 g/L) e baixa relação C/P (12,8). Na Figura 4.11, foi obtido um fator de conversão de 0,4 g/g ao utilizar alta relação C/N (147,2) e baixa relação C/P (12,8).

Portanto, a melhor condição para aumentar o fator de conversão de substrato em produto (0,24 a 0,4 g/g) foi utilizando baixa concentração de glicerol (13,2 g/L), alta relação C/N (147,2) e baixa relação C/P (13,2), com valores superiores aos mencionados na literatura.

Santa Anna *et al.* (2002) obtiveram resultados inferiores de $Y_{P/S}$ (0,13 g/g) ao utilizar glicerol (3% v/v) e relação C/N de 60. Esta diferença de resultado por estar relacionada a uso de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Estes autores ainda verificaram que o aumento da concentração de glicerol para 6% (v/v), reduzia o $Y_{P/S}$ para 0,086 g/g, indicativo do efeito inibidor do glicerol, também observado neste trabalho.

É importante frisar que, na faixa considerada mais apropriada para obtenção de uma maior concentração de ramnolipídios e índice de emulsificação, correspondente a concentração de glicerol de 13,2 g/L, relação C/N de 12,8 e relação C/P de 40, foi possível a obtenção de bons valores de $Y_{P/S}$ (ao redor de 0,26 g/g).

4.5.2 – Fator de Conversão de Substrato em Célula ($Y_{X/S}$)

Pela análise de variância (ANOVA) verificou-se que o modelo empírico obtido para este fator não foi validado, no entanto podem-se obter, com os resultados, os efeitos das variáveis no $Y_{X/S}$, como mostra a Figura 4.12.

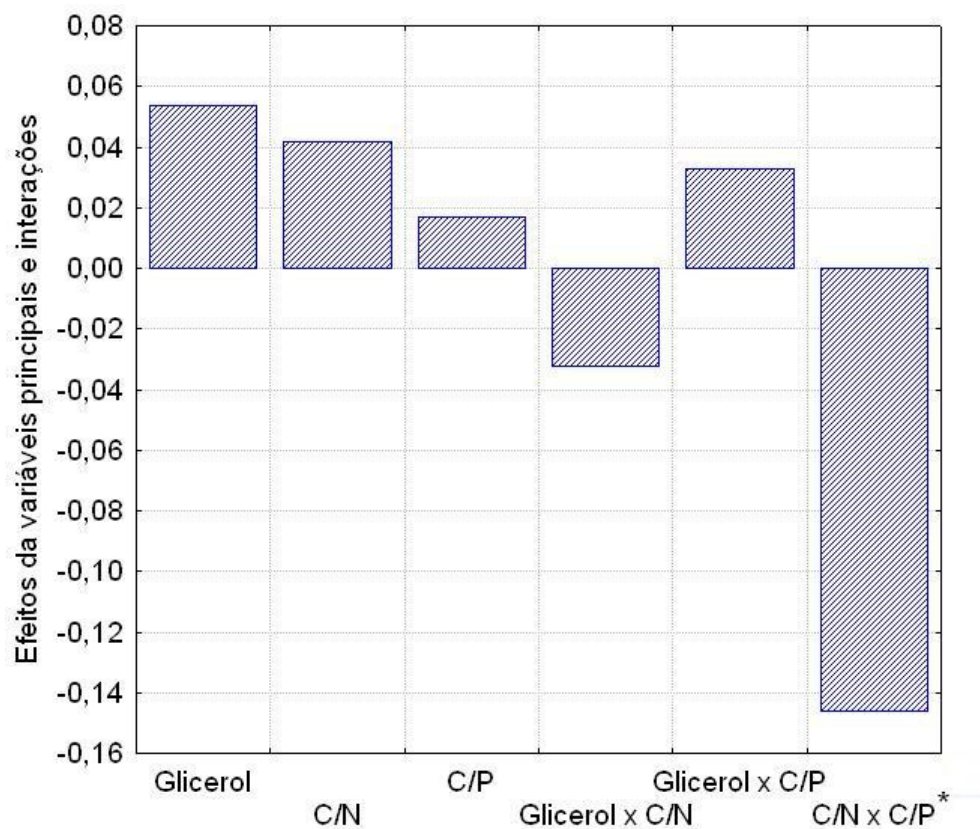


Figura 4.12 - Efeito das variáveis independentes no parâmetro cinético $Y_{X/S}$. * Variável significativa a 95% de confiança ($p < 0,05$)

A partir da Figura 4.12, pode-se dizer que o incremento das variáveis independentes (concentração de glicerol, relação C/N e relação C/P) do nível inferior (-1) para o nível superior (+1), apresenta, em sua maioria, um efeito positivo nos resultados, aumentando em torno de 0,03 g/g o parâmetro cinético $Y_{X/S}$.

4.5.3 – Fator de Conversão de Célula em Produto ($Y_{P/X}$)

Pela análise de variância (ANOVA) verificou-se que o modelo empírico para este fator não foi validado, no entanto foram verificados os efeitos das variáveis independentes neste parâmetro cinético, conforme mostra a Figura 4.13.

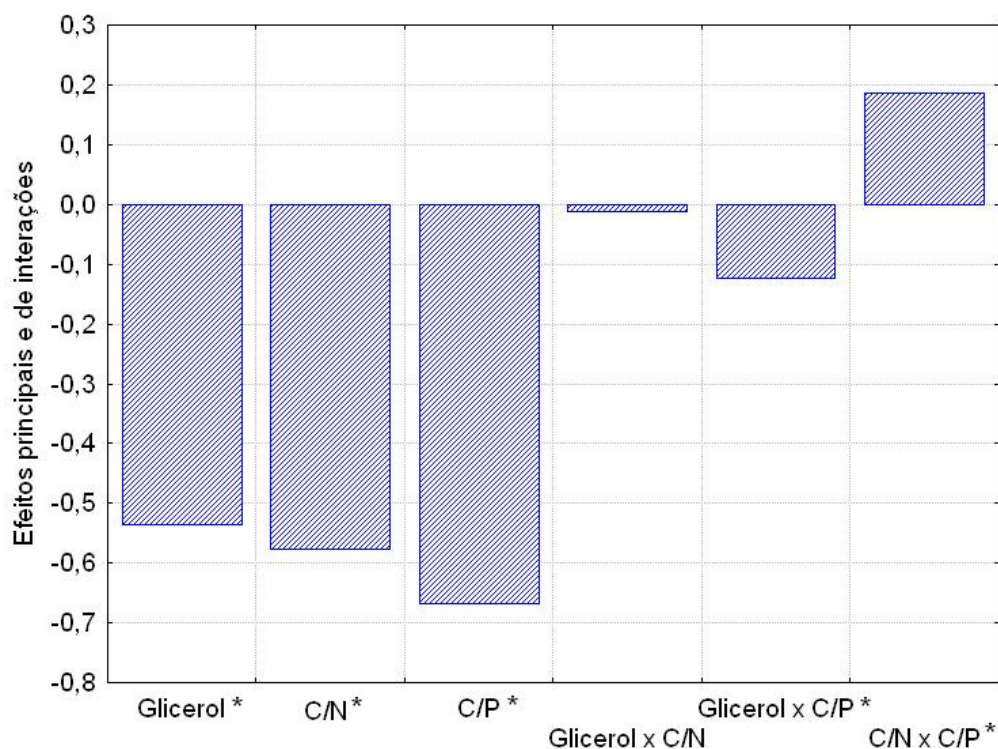


Figura 4.13 - Efeito das variáveis independentes no parâmetro cinético $Y_{P/X}$. * Variável significativa a 95% de confiança ($p < 0,05$)

Na Figura 4.13, pode-se perceber que o incremento das variáveis independentes (concentração de glicerol, relação C/N e relação C/P) do nível inferior (-1) para o nível superior (+1), apresentou, em sua maioria, um efeito negativo nos resultados, diminuindo em cerca de 0,5 g/g o parâmetro cinético $Y_{P/X}$.

De acordo com a Tabela 1, obteve-se resultados de $Y_{P/S}$ compreendidos entre 0,88 e 0,97, sendo estes valores maiores ao encontrado por Santa Anna *et al.* (2002), com *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em meio contendo glicerol como fonte de carbono e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio (C/N=60), que conseguiram $Y_{P/X}$ igual a 0,7 g/g.

4.6 – Tensão Superficial

A Tabela 4.9 apresenta os resultados de redução da tensão superficial do biossurfactante no final do processo fermentativo.

Tabela 4.9 - Medida da tensão superficial

Ensaio	TS (mN/m)		Redução da TS (%)
	Inicial	Final	
1	59,0	33,7	42,88
2	62,5	32,5	48,00
3	58,5	31,2	46,67
4	60,5	31,7	47,60
5	70,0	33,7	51,86
6	57,6	34,5	40,10
7	59,6	31,8	46,64
8	61,4	39,6	35,50
9	66,1	31,0	53,10
10	70,2	33,4	52,42
11	65,7	33,1	49,62
12	64,7	40,6	37,25
13	62,9	29,6	52,94
14	66,8	37,5	43,86
15	70,8	33,9	52,12
16	68,5	33,4	51,24
17	70,8	33,4	52,82

TS é a Tensão Superficial

Para o tempo de 120 h foi possível a validação de um modelo matemático empírico codificado, apresentado na Equação 4.4.

$$RTS = 51,71 - 1,32X_1 - 1,99X_2 - 3,61X_2^2 - 1,93X_3 - 1,85X_3^2 - 3,61X_1X_3 - 1,65X_2X_3 \quad (4.4)$$

Onde:

RTS = redução da tensão superficial (%);

X_1 = concentração de glicerol;

X_2 = relação C/N;

X_3 = relação C/P.

O modelo codificado foi validado pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 4.10. Verifica-se que o coeficiente de correlação obtido ($R=0,91$) e o valor de F ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$), permitem a construção das superfícies de respostas, apresentadas nas Figuras 4.14, 4.15 e 4.16.

Tabela 4.10 - ANOVA para a redução da tensão superficial.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calculado}
Regressão	429,25	7	61,32	6,69
Resíduo	82,55	9	9,17	
Erro Puro	1,26	2		
Falta de Ajuste	81,29	7		
Total SS	511,80	16		

F_{tabelado} = 3,29; Coeficiente de correlação (R) = 0,91

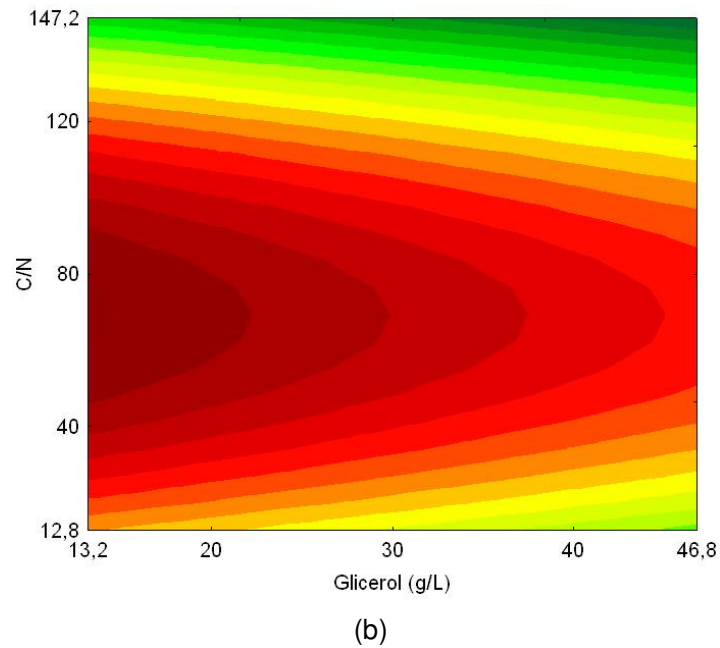
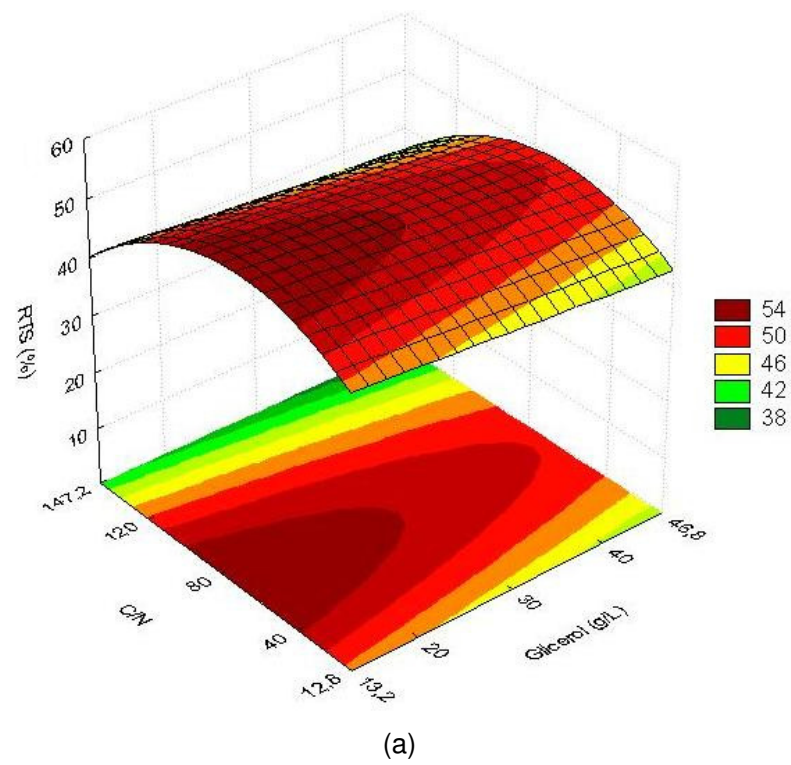


Figura 4.14 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a redução da tensão superficial em função da concentração de glicerol e da relação C/N (relação C/P = 80).

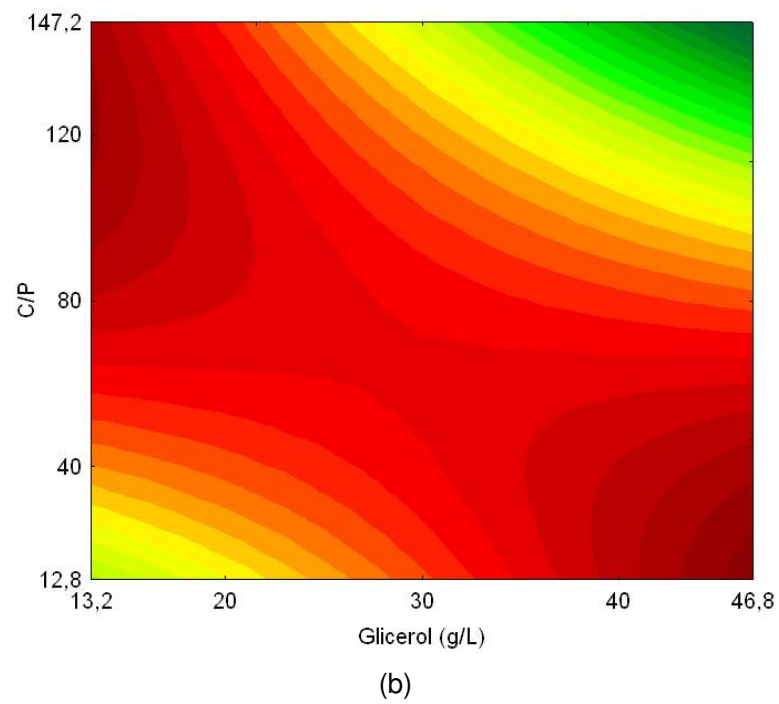
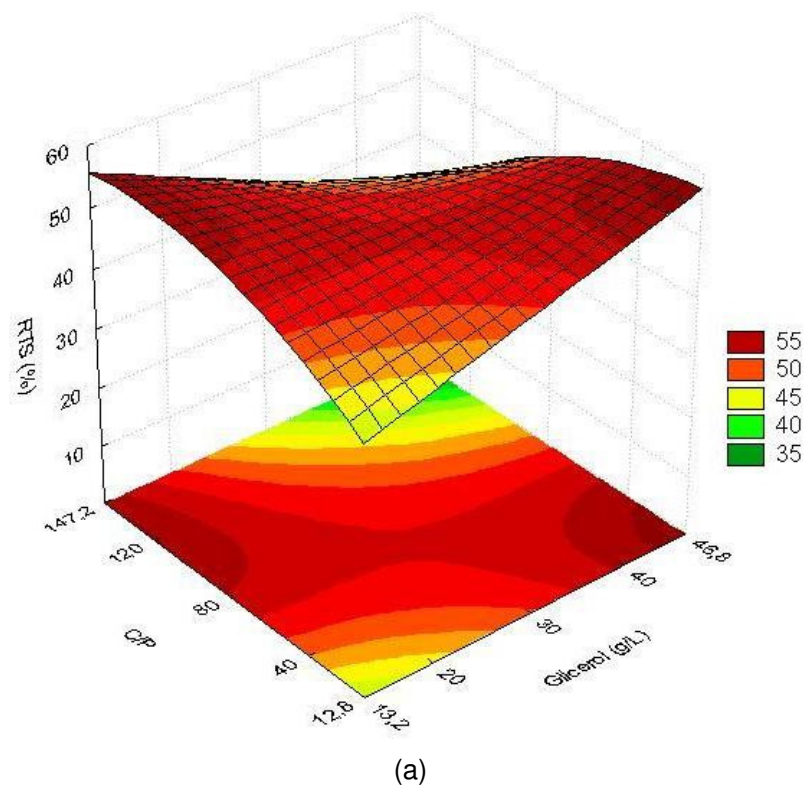
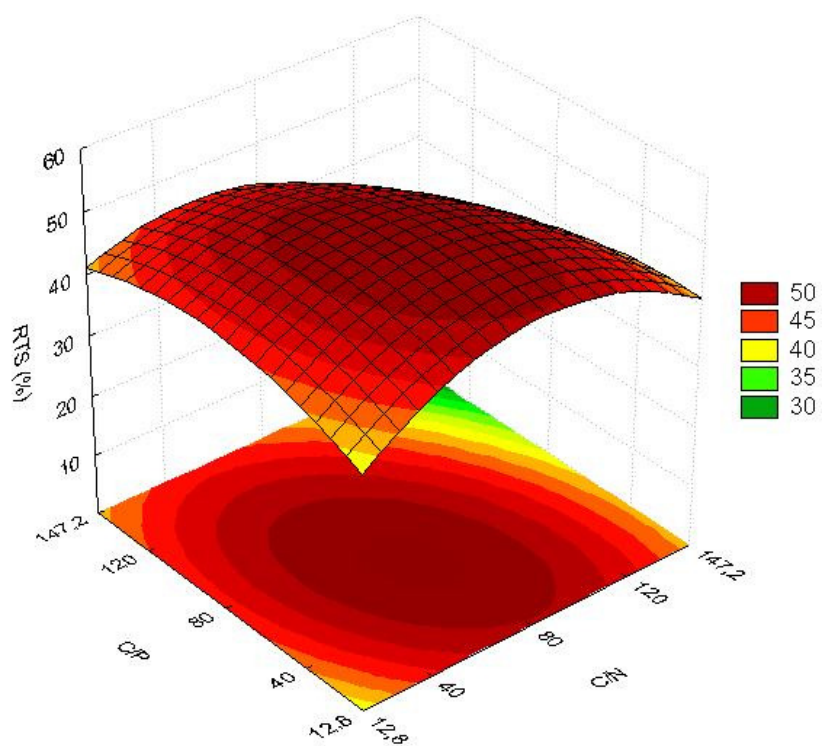
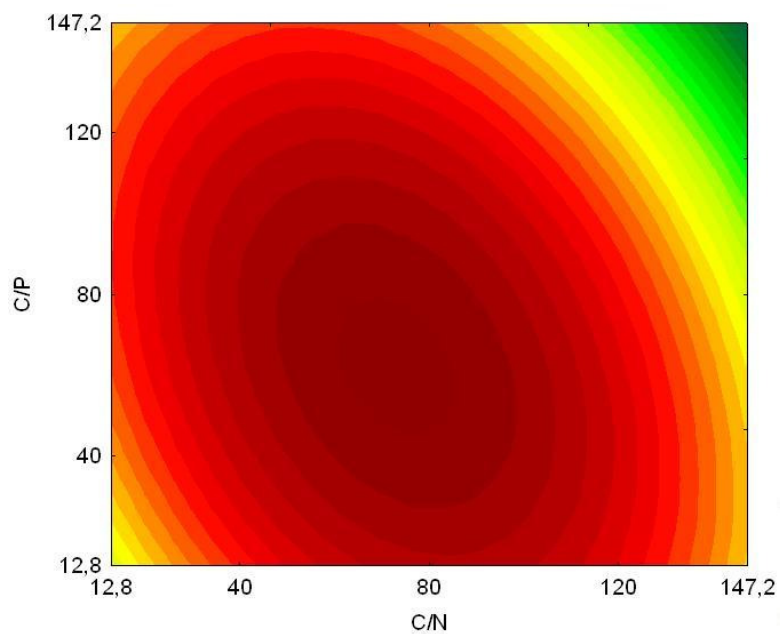


Figura 4.15 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a redução da tensão superficial em função da concentração de glicerol e da relação C/P (relação C/N = 80).



(a)



(b)

Figura 4.16 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a redução da tensão superficial em função da relação C/N e da relação C/P (concentração de glicerol = 30 g/L).

Na Figura 4.14 pode-se observar que a maior redução da tensão superficial, 54%, foi alcançada ao utilizar relação C/N de 40 a 80, com uma concentração de glicerol que pode variar, aproximadamente, de 13,2 g/L até 20 g/L.

Na Figura 4.15 pode-se constatar dois pontos favoráveis para redução da tensão superficial. Ao utilizar relação C/P de 100 até 147,2, em baixas concentrações de glicerol e na condição oposta, empregando altas concentrações de glicerol cerca de 46,8 g/L, mas utilizando baixa relação C/P, que pode variar de 12,8 até aproximadamente 40. Em ambas condições foi atingido uma redução de 55 % na tensão superficial.

A Figura 4.16 apresenta melhor região de trabalho para a redução da tensão superficial onde a relação C/N deve estar compreendida entre 50 e 100, aproximadamente, enquanto que a relação C/P deve estar compreendida entre 25 e 100.

Portanto, verificou-se redução da tensão superficial igual ou maior que 50%, ao utilizar glicerol em baixa concentração (13,2 g/L), relação C/N de aproximadamente 80 e relação C/P de 25 ou 100.

Pela Tabela 4.9, verifica-se que a maior redução da tensão superficial foi de 53,1%. Situação semelhante foi encontrada por Benincasa & Accorsini (2007) que reduziram a tensão superficial da água em 52,8%, utilizando ramnolípido purificado de *Pseudomonas aeruginosa* LB1. Santa Anna *et al.* (2002) observaram redução de 48,2% na tensão superficial para *Pseudomonas aeruginosa* PA1 cultivada em meio contendo glicerol (1%) como fonte de carbono e C/N de 20.

CAPÍTULO V – CONCLUSÕES

5 – Conclusão

A síntese do biossurfactante não se caracterizou como cinética de crescimento associado, mas provavelmente como um metabólito secundário.

De acordo com a validação dos modelos empíricos e análise das superfícies de respostas, a condição que permite obter maior produção de ramnolipídio associada a um alto índice de emulsificação é a que utiliza concentração de glicerol de 13,2 g/L, relação C/N de 12,8 e relação C/P na faixa de 40, sendo possível estimar os valores de $Y_{P/S}$ (0,26) e redução da tensão da tensão superficial do meio de produção (38,33%), a partir dos modelos empíricos, para esta condição.

De acordo com as superfícies de respostas, a condição mais favorável para obter maior conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) é a que utiliza concentração de glicerol de 13,2 g/L, relação C/N de 147,2 e C/P 12,8.

Verificou-se ainda, que o incremento das variáveis apresentou, na sua maioria, efeito positivo no fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$), em média de 0,03 g/g.

Para o fator de conversão de célula em produto ($Y_{P/X}$), foi observado que o incremento das variáveis apresentou, em sua maioria, efeito negativo, em média de 0,5 g/g.

Por fim, verificou-se através das superfícies de respostas que para obter maior redução da tensão superficial (valores iguais ou superiores a 50%), deve-se utilizar glicerol em baixa concentração (13,2 g/L), relação C/N de aproximadamente 80 e relação C/P de 25 ou 100.

CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 - Referências Bibliográficas

- ABOUSEOUD, M., MAACHI, R., AMRANE, A., BOUDERGUA, A., NABI, A., Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*, **Desalination**, n. 223, p. 143 – 151, 2008.
- BAZIRE, A., DHEILLY, A., DIAB, F., MORIN, D., JEBBAR, M., HARAS, D., DUFOUR, A., Osmotic stress and phosphate limitation alter production of cell-to-cell signal molecules and rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 253, p. 125 – 131, 2005.
- BENINCASA, M., CONTIERO, J., MANRESA, M. A., MORAES, I. O., Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 54, p. 283 – 288, 2002.
- BENINCASA, M. and ACCORSINI, F. R., *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. **Bioresource Technology**, *In press*, 2007.
- BICCA, F. C., FLECK, L. C., AYUB, M. A. Z., Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 231 – 236, 1999.
- BORSCHIVER, S. Desafios da sustentabilidade. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v. 22, p. 24-25, 2006.
- CHEN, S-Y., WEI, Y-H., CHANG, J-S., Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v. 76, p. 67 – 74, 2007.
- COSTA, S. G. A. O., NITSCHKE, M., HADDAD, R., EBERLIN, M. N., CONTIERO, J., production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483 – 488, 2006.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F., Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3 , p. 350 – 356, 1956.
- GAUTAM, K. K. and TYAGI, V. K., Microbial surfactant: a review. **Journal of Oleo Science**, v. 55, n. 4, p. 155 – 166, 2006.
- GOMES, J., KUMAR, D., Production of l-methionine by submerged fermentation: a

review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 3 – 18, 2005.

GOUVEIA, E. R., LIMA, D. P. A., DUARTE, M. S., LIMA, G. M. S., ARAÚJO, J. M., Bactérias produtoras de biossurfactantes. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 30, p. 39 – 45, 2003.

GUERRA-SANTOS, L., KÄPPELI, O., FIECHTER, A., *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 301 – 305, 1984.

MAIER, R. M. & SOBERÓN-CHAVEZ, G., *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potencial applications. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v. 54, p. 625 – 633, 2000.

MONTEIRO, S. A., SASSAKI, G. L., SOUZA, L. M., MEIRA, J. A., ARAÚJO, J. M., MITCHELL, D. A., RAMOS, L. P., KRIEGER, N., Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 147, p. 1 – 13, 2007.

MORAES, I. O., BENINCASA, M., ALEGRE, R. M., Production and characterization of rhamnolipids produced by newly isolated strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Brazilian Journal of Food Technology**, n. 5, p. 145 – 149, 2002.

MULLIGAN, C. N., Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 113, p. 183 – 198, 2005.

NGUYEN, T. T., YOUSSEF, N. H., MCINERNEY, M. J., SABATINI, D. A., Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. **Water Research**, *In press*, 2007.

NITSCHKE, M. & PASTORE, G. M., Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772 – 776, 2002.

NITSCHKE, M. & PASTORE, G. M., Biossurfactantes a partir de resíduos agroindustriais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 31, p. 63-67, 2003.

NITSCHKE, M. & PASTORE, G. M., Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 336 - 34, 2006.

NITSCHKE, M & COSTA, S. G. V. A. O., Biosurfactants in food industry. **Food Science and Technology**, v. 18, p. 252 – 259, 2007.

PANDEY, A., Solid-state fermentation, **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81

– 84, 2003.

PAPAGIANNI, M., NOKES, S. E., FILER, K., Submerged and solid-state phytase fermentation by *Aspergillus niger*. Effects of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculum performance. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 319 – 326, 2001.

PRIETO, L. M., Produção, Caracterização parcial e aplicação ambiental de ramnolipídio de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de resíduos de pescado capturado no extremo sul do Brasil. **Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos**, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2007.

PRIETO, L. M., MICHELON, M., BURKERT, J. F. M., KALIL, S. J., BURKERT, C. A. V., The production of rhamnolipid by a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a southern coastal zone in Brazil. **Chemosphere** (2008), doi:10.1016/j.chemosphere.2008.01.003.

QUINES, L. K. M., BIANCHINI, C. S., SANZO, A. V. L., BURKERT, C. A. V., KALIL, S. J., Isolamento de bactérias produtoras de lipase a partir de resíduos da indústria de pescado. **Anais da XXIV Reunião de Genética de Microrganismos**, Gramado – RS, 2004.

RASHEDI, H., JAMSHIDI, E., ASSADI, M. M., BONAKDARPOUR, B., Isolation and production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian southern wells oil. **International Journal of Environmental and Science Technology**, v. 2, n. 2, p. 121 – 127, 2005.

RASHEDI, H., JAMSHIDI, E., ASSADI, M. M., BONAKDARPOUR, B., Biosurfactant production with glucose as a carbon source. **Chemecal & Biochemical Engineering Quarterly**, v. 20, n. 1, p. 99 – 106, 2006.

RAZA, Z. A., REHMAN, A., MUHAMMAD, S. K., KHALID, Z. M., Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. **Biodegradation**, v. 18, p. 115 – 121, 2007.

REGULY, J. C., **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**, v. 2, Editora e Gráfica Universitária – UFPel, Pelotas – RS, 1998.

REGULY, J. C., **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**, v. 3, Editora e Gráfica Universitária – UFPel, Pelotas – RS, 2000.

SÁNCHEZ, M., TERUEL, J. A., ESPUNY, M. J., MARQUÉS, A., ARANDA, F. J.,

MANRESA, A., ORTIZ, A., Modulation of the physical properties of dielaidoylphosphatidylethanolamine membranes by a dirhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Chemistry and Physics of Lipids**, n. 142, p. 118 – 127, 2006

SÁNCHEZ, M., ARANDA, F. J., ESPUNY, M. J., MARQUÉS, A., TERUEL, J. A.,, MANRESA, A., ORTIZ, A., Aggregation behaviour of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media. **Journal of Colloid and Interface Science**, p. 246 – 253, 2007.

SANTA ANNA, L. M., SEBASTIAN, G. V., MENEZES, E. P., ALVES, T. L. M., SANTOS, A. S., PEREIRA JR, N., FREIRE, D. M. G., Production of biosurfactante from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, p. 159 – 166, 2002.

SCHMIDELL, W., LIMA, A. U., AQUARONE, E., BORZANI, W., **Biotechnologia Industrial**, v. 2, Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 2001.

TAHZIBI, A., KAMAL, F., ASSADI, M. M., Improved Production of Rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* Mutant. **Iranian Biomedical Journal**, v. 8, p. 25 – 31, 2004.

WU, J., JU, L.-K., Extracellular particles of polymeric material formed in n-hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, v. 59, p. 193–202, 1998.

WU, J.-Y., YEH, K.-L., LU, W.-B., LIN, C.-L., CHANG, J.-S., Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. **Bioresource Technology**, 99, 1157 - 1164, 2008.

ANEXOS

Anexos

Anexo 1 – Curvas de calibração

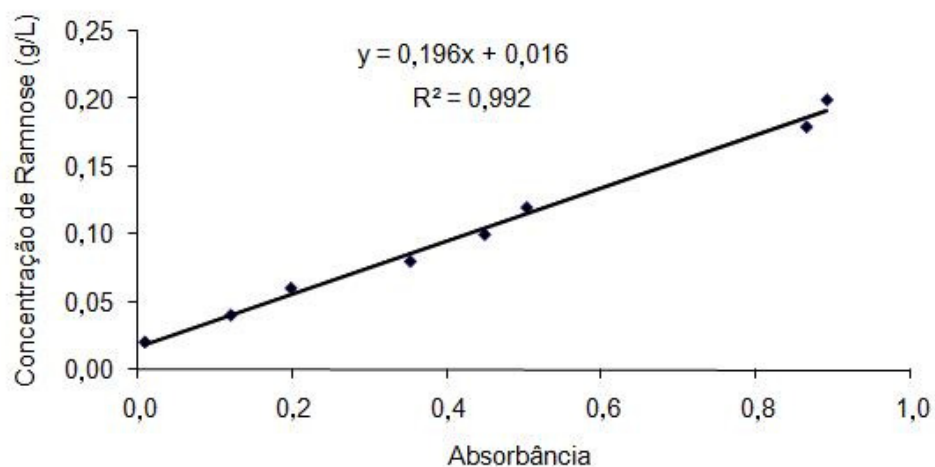


Figura 1a - Curva padrão de ramnose

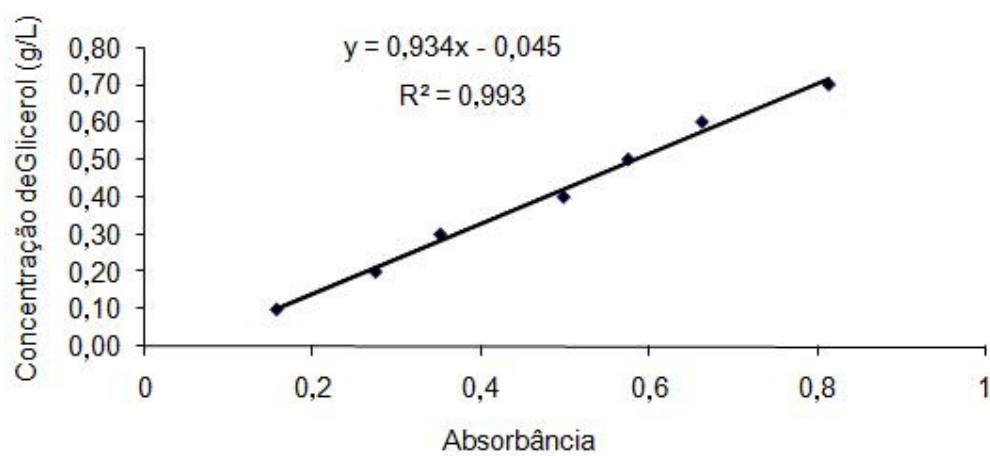


Figura 1b - Curva padrão de glicerol

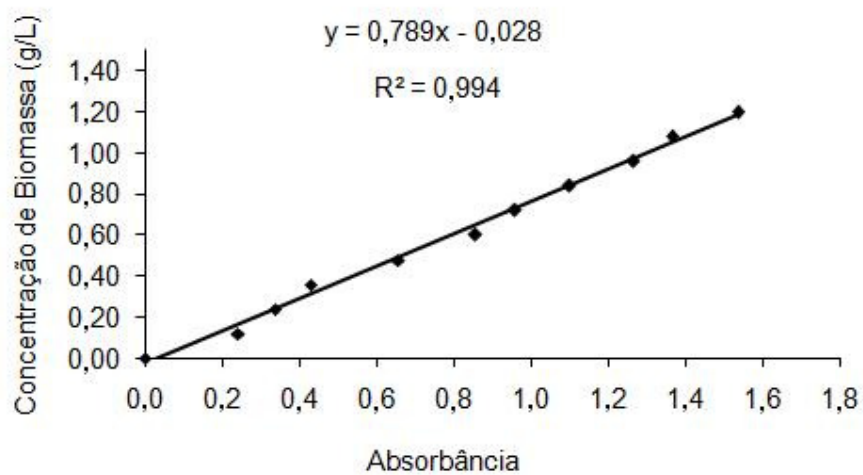


Figura 1c - Curva padrão de biomassa

Anexo 2 – Curvas cinéticas dos ensaios de fermentação

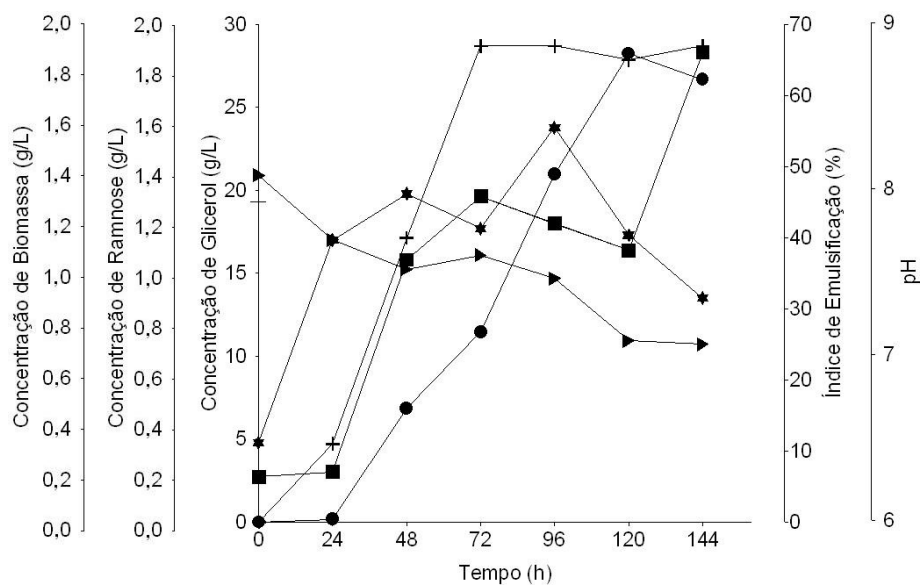


Figura 2a – Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 1. Condições: 20 g/L de glicerol, relação C/N de 40 e relação C/P de 40. ▶ Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.

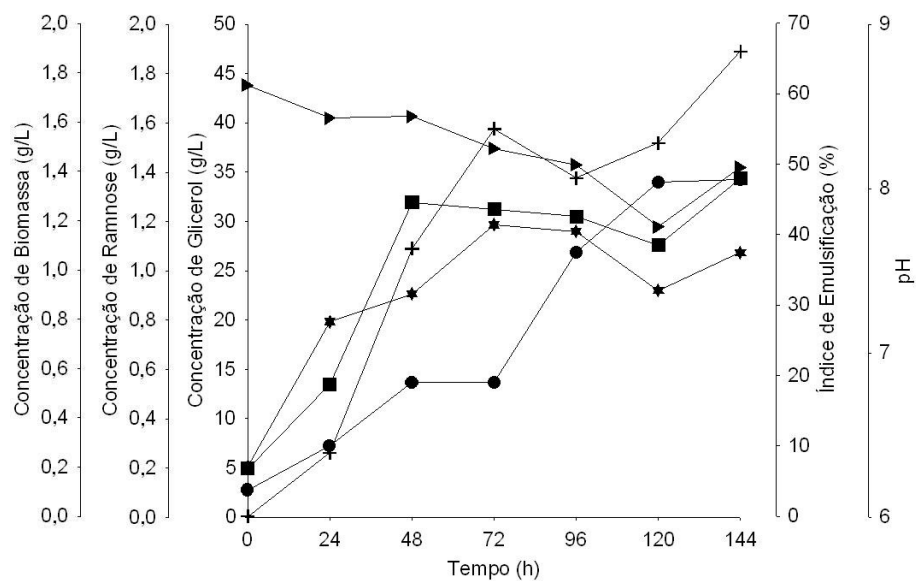


Figura 2b - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 2.
Condições: 40 g/L de glicerol, relação C/N de 40 e relação C/P de 40. ▴ Glicerol; ● Ramnose;
■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.

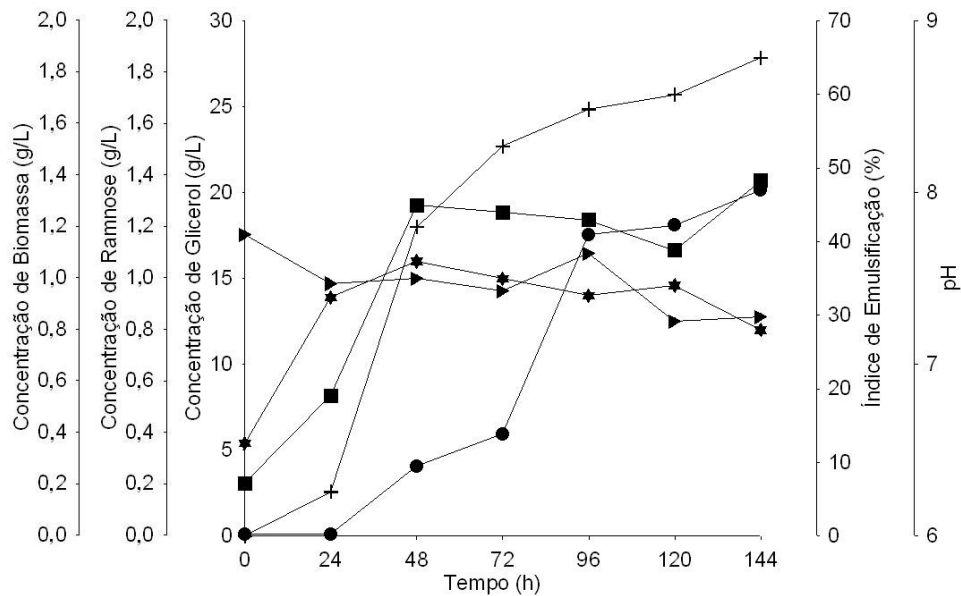


Figura 2c - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 3.
Condições: 20 g/L de glicerol, relação C/N de 120 e relação C/P de 40. ▴ Glicerol; ● Ramnose;
■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.

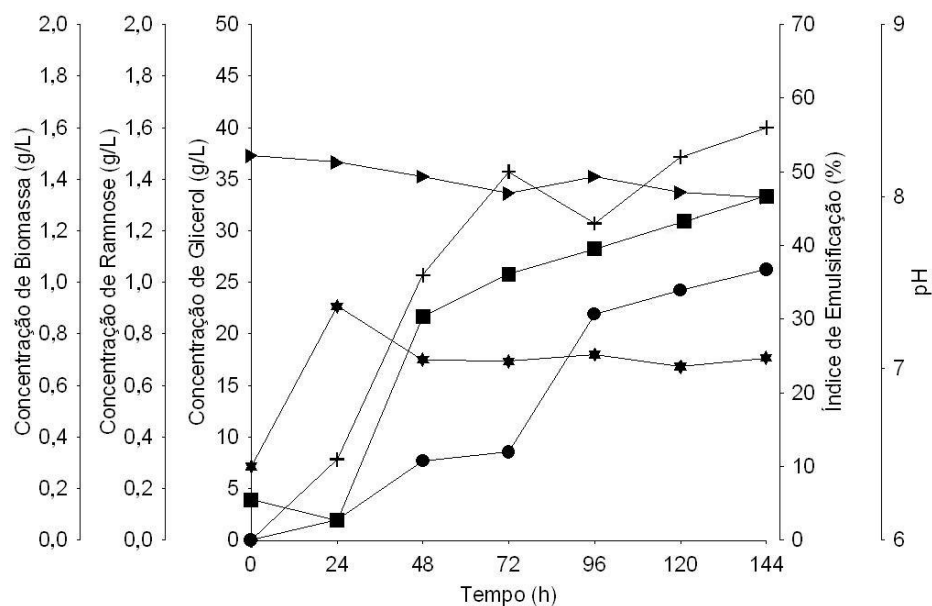


Figura 2d - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 4.
Condições: 40 g/L de glicerol, relação C/N de 120 e relação C/P de 40. ▴ Glicerol; ● Ramnose;
■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.

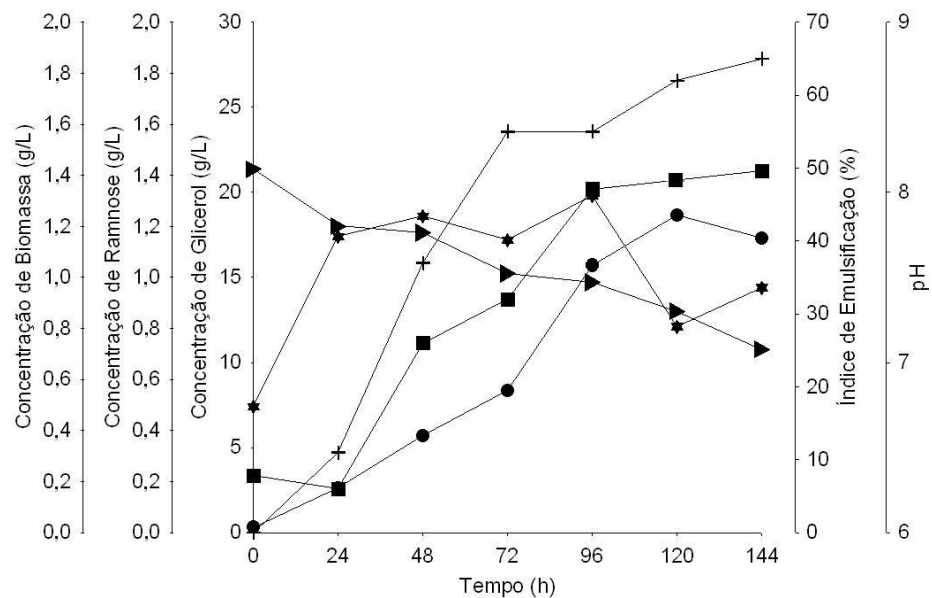


Figura 2e - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 5.
Condições: 20 g/L de glicerol, relação C/N de 40 e relação C/P de 120. ▴ Glicerol; ● Ramnose;
■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.

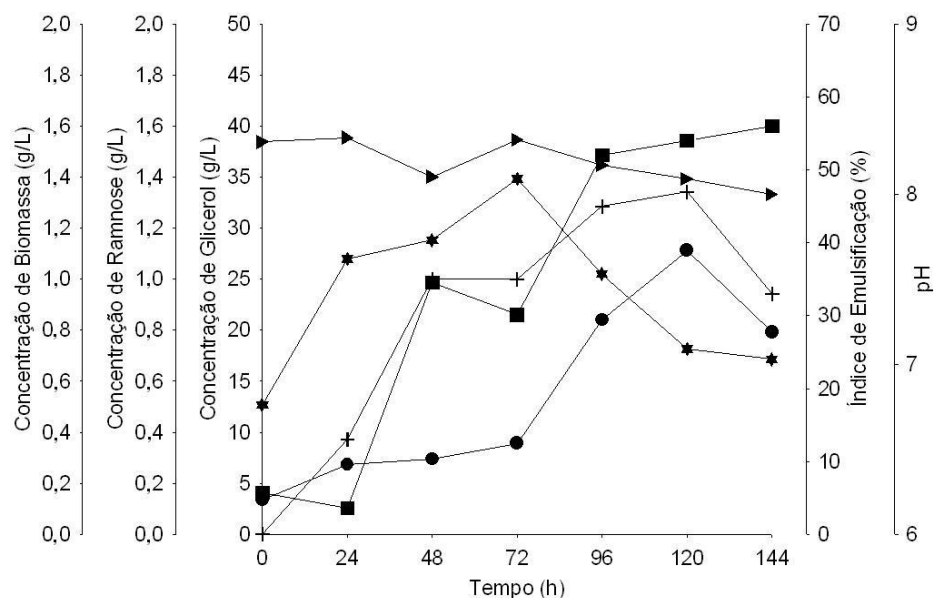


Figura 2f - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 6.
Condições: 40 g/L de glicerol, relação C/N de 40 e relação C/P de 120. ▶ Glicerol; ● Ramnose;
■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.

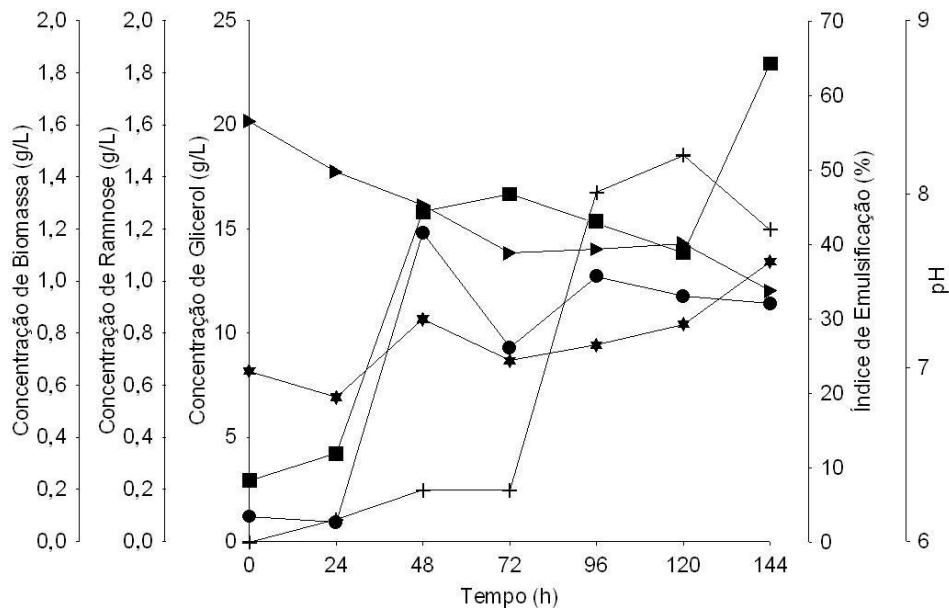


Figura 2g - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 7.
Condições: 20 g/L de glicerol, relação C/N de 120 e relação C/P de 120. ▶ Glicerol; ●
Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.

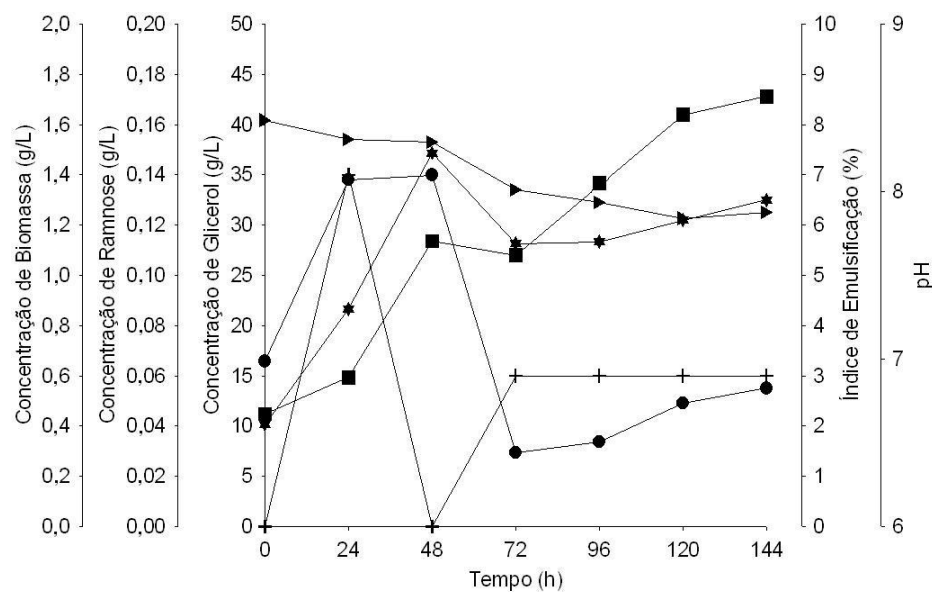


Figura 2h - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 8.

Condições: 40 g/L de glicerol, relação C/N de 120 e relação C/P de 120. ▶ Glicerol; ● Biomassa; ■ Ramnose; + Índice de Emulsificação; ★ pH.

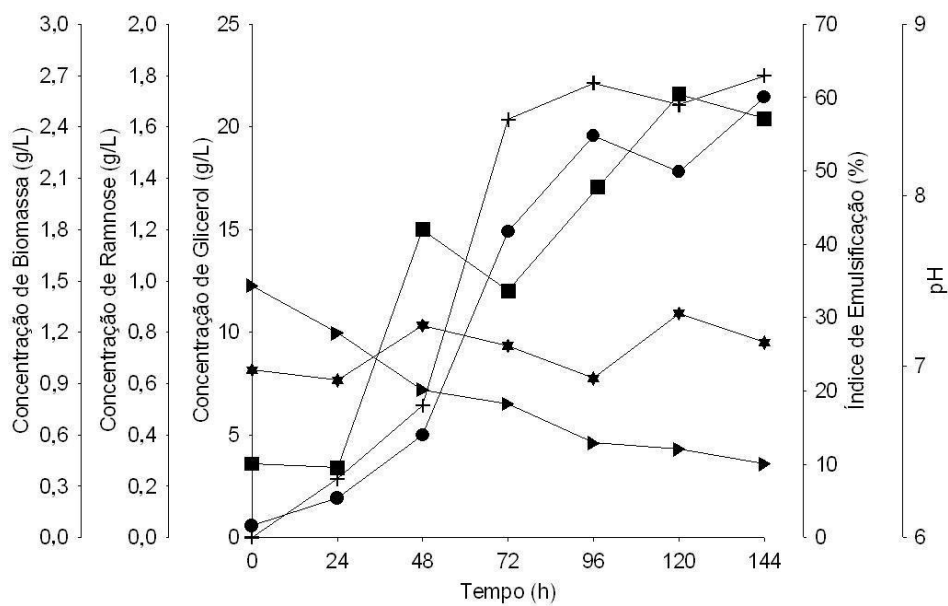


Figura 2i - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 9.

Condições: 13,2 g/L de glicerol, relação C/N de 80 e relação C/P de 80. ▶ Glicerol; ● Biomassa; ■ Ramnose; + Índice de Emulsificação; ★ pH.

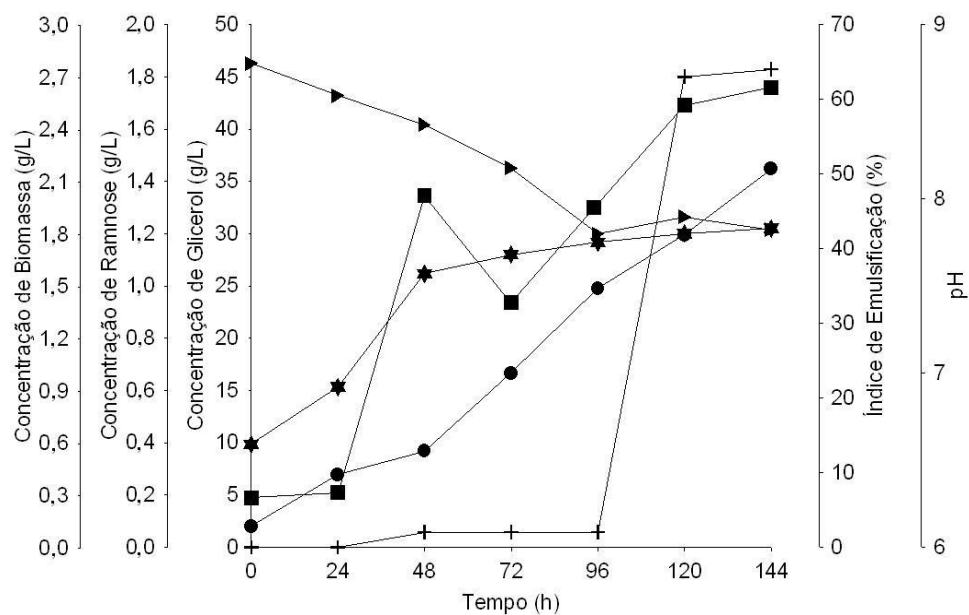


Figura 2j - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 10.

Condições: 46,8 g/L de glicerol, relação C/N de 80 e relação C/P de 80. ► Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.

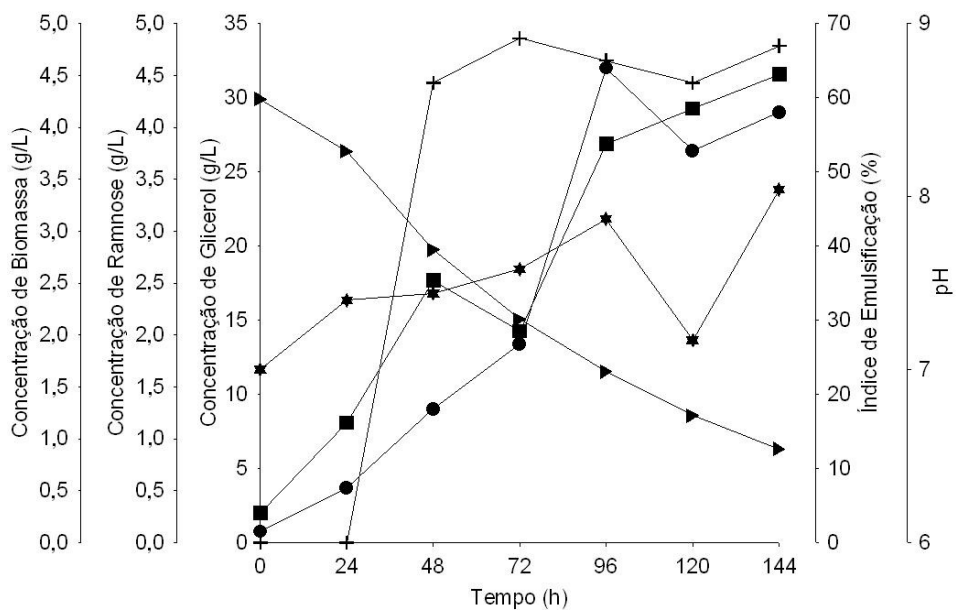


Figura 2l - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 11.

Condições: 30 g/L de glicerol, relação C/N de 12,8 e relação C/P de 80. ► Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.

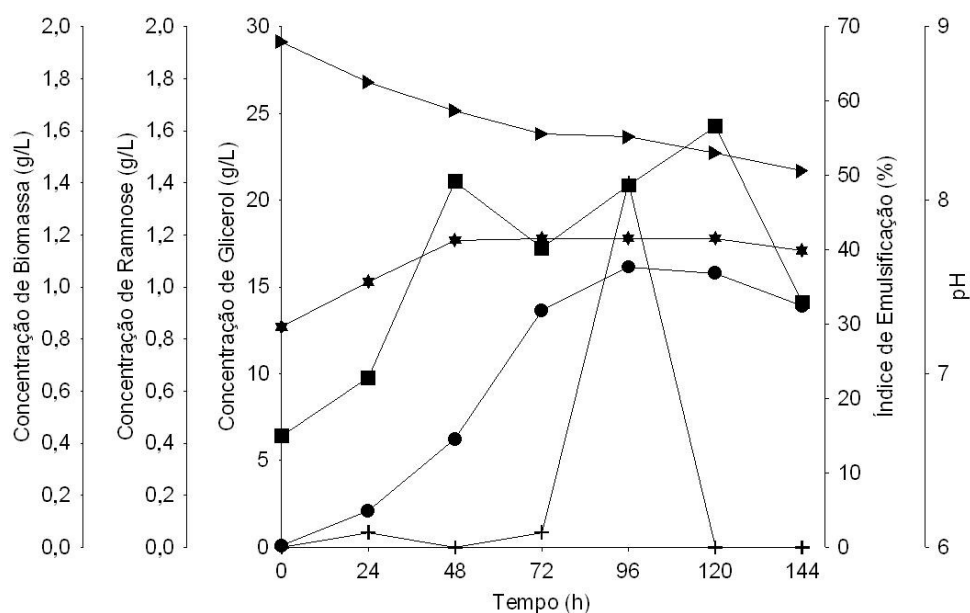


Figura 2m - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 12.

Condições: 30 g/L de glicerol, relação C/N de 147,2 e relação C/P de 80. ▶ Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.

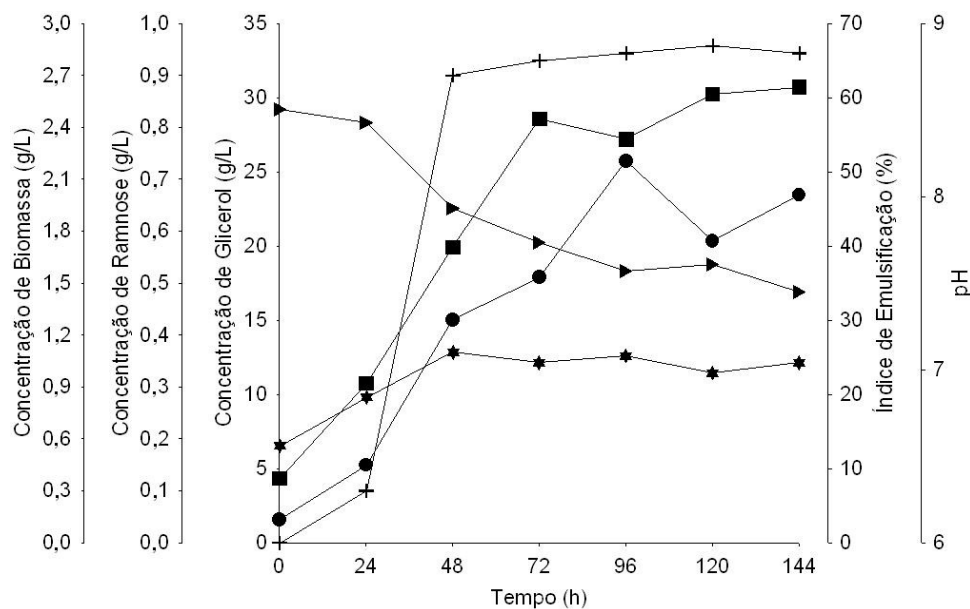


Figura 2n - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 13.

Condições: 30 g/L de glicerol, relação C/N de 80 e relação C/P de 12,8. ▶ Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.

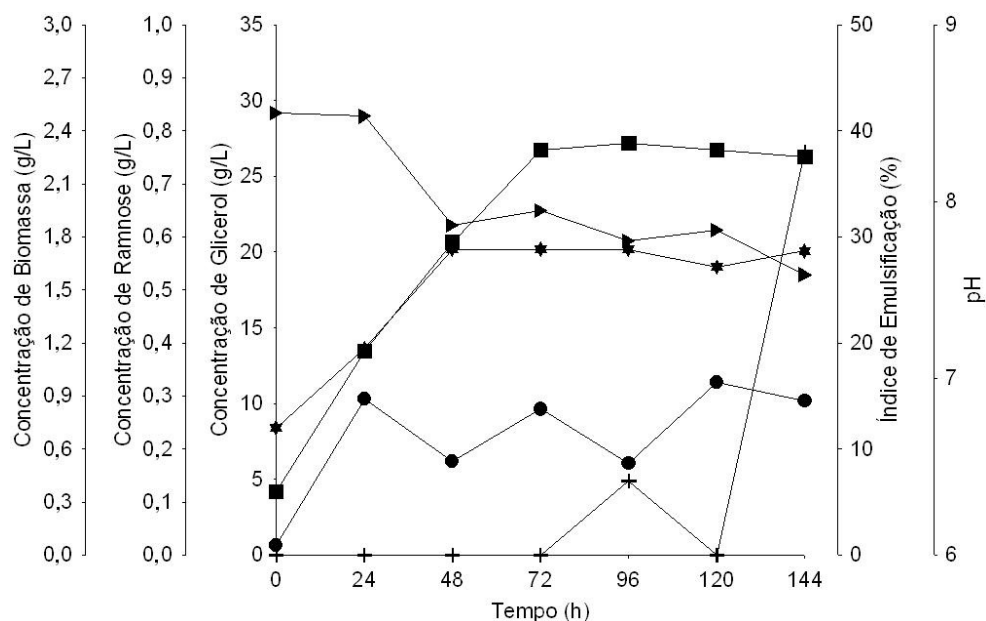


Figura 2o - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 14.

Condições: 30 g/L de glicerol, relação C/N de 80 e relação C/P de 147,2. ▸ Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.

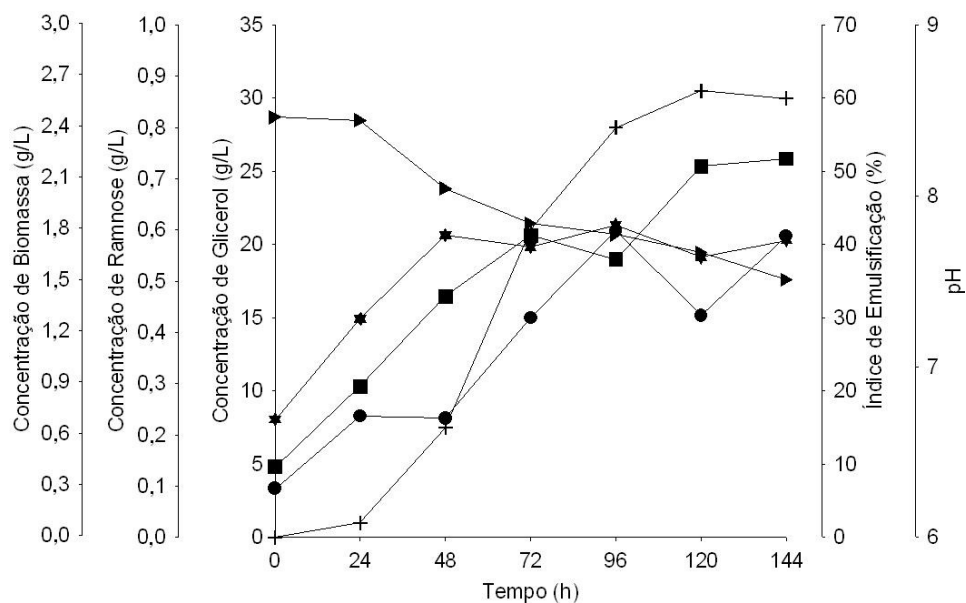


Figura 2p - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 15.

Condições: 30 g/L de glicerol, relação C/N de 80 e relação C/P de 80.

▸ Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.

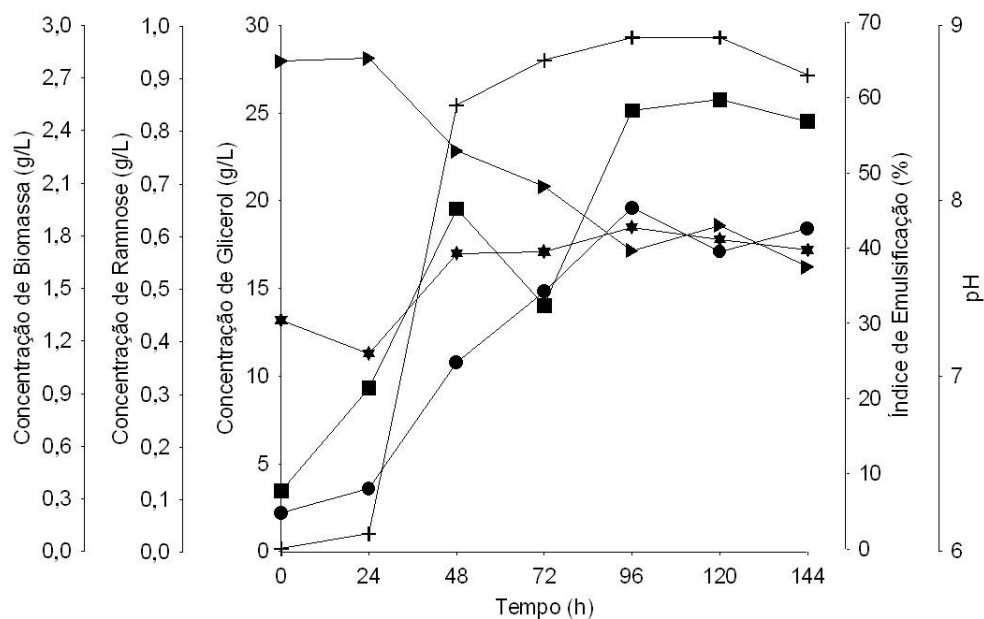


Figura 2q - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 16.

Condições: 30 g/L de glicerol, relação C/N de 80 e relação C/P de 80.

► Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.

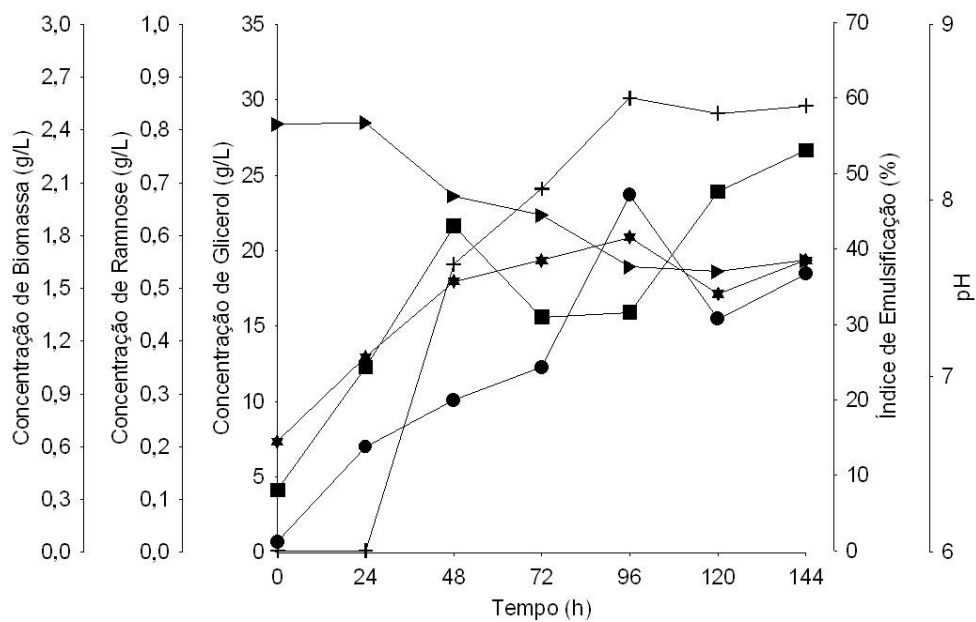


Figura 2r - Acompanhamento do processo fermentativo ao longo do tempo para o ensaio 17.

Condições: 30 g/L de glicerol, relação C/N de 80 e relação C/P de 80.

► Glicerol; ● Ramnose; ■ Biomassa; + Índice de Emulsificação; ★ pH.