Universidade Federal do Rio de Janeiro

Escola de Química

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

Produção de Biossurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 a Partir de Glicerol

Autora: Flávia Padilha Bastos dos Santos

Orientadora: Dra. Francisca Pessôa de França

Co–Orientadora: Dra.Léa Maria de Almeida Lopes

RIO DE JANEIRO

22 de Novembro de 2011

FLAVIA PADILHA BASTOS DOS SANTOS

Produção de Biossurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 a Partir de Glicerol

EQ/UFRJ

dos Santos, F. P. B/ Novembro 2011

FLAVIA PADILHA BASTOS DOS SANTOS

Produção de Biossurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 a Partir de Glicerol

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

ESCOLA DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
22 de Novembro de 2011

FICHA CATALOGRÁFICA

S237p Santos, Flávia Padilha Bastos dos.

Produção de Biossurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* EQ109 a Partir de Glicerol/ Flávia Padilha Bastos dos Santos. – 2011.
xx, 122 f.: il.

Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2011.

Orientadoras: Francisca Pessôa de França e Léa Maria de Almeida Lopes

1. Biossurfatante. 2. *Biosurfactant*. 3. Produção. 4. Glicerol. 5. Planejamento de experimentos. 6. *Pseudomonas aeruginosa*. 7. Biodiesel. – Teses. I. França, Francisca Pessôa de. (Orient.). II. Lopes, Léa Maria de Almeida (Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. IV. Título.

CDD: 579.26

FLAVIA PADILHA BASTOS DOS SANTOS

Produção de Biossurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 a Partir de Glicerol

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

APROVADA POR:

Dra. Francisca Pessoa de França – TPQB/UFRJ

Dra. Léa Maria de Almeida Lopes – IMA/UFRJ

Dr. Leon Rabinovitch – LFB/IOC/FIOCRUZ/RJ

Dr. Silvio Silvério da Silva – EEL/USP

Dra. Vicelma Luiz Cardoso – EQ/UFU

Dra. Cheila Gonçalves Mothé – TPQB/UFRJ

Dra. Eliana Flávia Camporese Sérvulo - TPQB/UFRJ

Rio de Janeiro, 22 de novembro de 2011

dos Santos, F. P. B/ Novembro 2011

“em Cristo todos os tesouros da sabedoria e do conhecimento estão ocultos.” *Colossenses 2.3*

Bíblia Sagrada

Ao meu Deus e ao meu Senhor Jesus Cristo, pela capacitação e pela graça.

Ofereço

dos Santos, F. P. B/ Novembro 2011

Ao meu marido Alex pela ajuda, pelo consolo, pelo incentivo e por estar sempre perto para me fazer crer no potencial que Deus depositou na minha vida.

À minha filha Manuela por compreender a minha ausência em muitos momentos, sempre com um sorriso no rosto.

Dedico

dos Santos, F. P. B/ Novembro 2011

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais Berenice e Ivon *(in memorian)* por me ensinarem que estudar é uma ferramenta fundamental para que sonhos profissionais se concretizem;

- Aos meus irmãos pelo apoio;

- As minhas orientadoras Francisca e Léa pela confiança e por me dar a liberdade necessária para o desenvolvimento de um bom trabalho de pesquisa;

- A minha sogra Sonely e ao meu sogro Ricardo que durante todo este trabalho foram quem, com carinho e atenção, ensinaram e cuidaram da minha filha Manuela;

- Ao meu cunhado Diogo e a Aretha pelo coração aberto e pela disponibilidade em me socorrer em todos os momentos;

- Ao meu pastor Edimilson e a Aurinha e aos membros da IEVV em Pedra de Guaratiba pelas orações e por todo o apoio espiritual;

- Aos jovens da IEVV em Pedra de Guaratiba, ao grupo de teatro, ao grupo de oração dos jovens e das mulheres, pela compreensão quando estive ausente;

- Aos membros da IEVV no Recreio dos Bandeirantes pelas orações e por se dedicarem com tanto amor aos sonhos que Deus depositou no meu coração;

- Aos meus amigos Caoxande e Marcela por acompanharem todo o meu crescimento e por estarem sempre por perto com uma palavra de vitória nos lábios;

- Aos meus amigos Ricardo e Kris pela dedicação e apoio incondicionais;

- Aos amigos do laboratório 109, Jamille, Ulrich, Tereza, Diogo, Aike, Renata, Cadu, Gustavo, Rafael Bittencourt, Camila, Rafael Lima, Dill, Milton, Kally, Felizberto, Virgínia, que juntos formaram uma equipe maravilhosa, onde se pôde ver que a ajuda mútua é fundamental para a realização de um excelente trabalho com desprendimento e o companheirismo. Ninguém vence sozinho, obrigada;

- Ao amigo Hugo Schumacher pela ajuda no inglês;

- Aos funcionários Marcia e Thiago pelas análises no Instituto de Macromoléculas Eloisa Mano;

- A professora Eliana Flávia pela gentileza de, por muitas vezes, ceder seu laboratório para ensaios e ao funcionário Paulinho;

- Aos funcionários da secretaria da pós-gradução Roselee, Julio, Lucia e Marlene pela amabilidade no atendimento;

- A Universidade Federal do Paraná na pessoa da professora Joana Léa, pela análise dos açúcares;

- Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento, CNPq, pelo apoio financeiro;

- A todos que de alguma forma trocaram experiências, informações, ensinamentos e puderam me ajudar a entender como conciliar o trabalho na família, em casa, na igreja e na universidade. OBRIGADA.

“Eu quero saber como Deus criou este mundo. Não estou interessado neste ou naquele fenômeno, no espectro deste ou daquele elemento. Eu quero conhecer os pensamentos Dele, o resto são detalhes”

Albert Einstein

dos Santos, F. P. B/ Novembro 2011

SANTOS, Flávia Padilha Bastos dos. Produção de Biossurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 a Partir de Glicerol. Rio de Janeiro, 2011. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)-Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

RESUMO

A oferta de glicerol, subproduto da produção de biodiesel, aumentou significativamente nos últimos anos, gerando um grande interesse por seu aproveitamento biotecnológico. Neste trabalho avaliou-se a produção de biossurfatante a partir de glicerol, empregando a *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 isolada de ambiente contaminado com óleo cru. Para avaliar as melhores respostas foi utilizado um planejamento fatorial 2^3, investigando a influência do pH, concentração inicial de biomassa e concentração inicial de glicerol . Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer com 500 mL de capacidade contendo 100 mL do meio de produção, sob agitação de 150 rpm, à temperatura de 30ºC ± 1ºC, realizando-se amostragens nos tempos 24h, 48h e 72 h. A produção de biossurfatante foi monitorada através da medida do índice de emulsificação em querosene de aviação, consumo de glicerol, diminuição da tensão superficial e biomassa final produzida no caldo livre de células, atingindo um valor de 75% para o índice de emulsificação do querosene de aviação com 72 horas de fermentação. Os resultados mostraram que as variáveis independentes que obtiveram melhores respostas foram pH 7,0; concentração inicial de glicerol, 50g/L e concentração inicial de biomassa de $6{,}3 \times 10^{-5}$ g/L. Com os parâmetros otimizados, foram realizados experimentos em fermentadores com capacidade de 2L e 3L e o biossurfatante produzido foi recuperado com um rendimento de 0,68g de biossurfatante/g de glicerol. Após a recuperação o biossurfatante foi purificado até cerca de 90% de pureza, dado este confirmado pela análise termogravimétrica TGA. No biossurfatante recuperado, foram realizados testes de estabilidade em diferentes salinidades e temperaturas, ensaio de tolerância ao cálcio, ensaio do índice de emulsificação de diferentes matérias-primas (hexano, biodiesel, borra oleosa, querosene de aviação) além da caracterização através da análise espectrométrica FTIR, análise reométrica e análise dos açúcares. Os resultados indicaram a possível formação de um ramnolipídeo estável em diferentes temperaturas e salinidades que emulsificou o querosene de aviação em solução a 100 mg/L de $CaCO_3$. A análise de açúcares revelou a formação de um biossurfatante composto de açúcares neutros composto de 19% de ramnose, 35% de manose, 2% de galactose e 44% de glicose.

SANTOS, Flávia Padilha Bastos dos. Produção de Biossurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 a partir de glicerol. Rio de Janeiro, 2011. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)-Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

ABSTRACT

The supply of glycerol, a byproduct of biodiesel production has increased significantly in the last years, generating a great interest in its use of biotechnology. In this study it was evaluated the production of biossurfactant from glycerol, using the EQ 109 *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the environment contaminated with crude oil. To evaluate the best responses it was used a 2^3 factorial design, investigating the influence of pH, initial biomass concentration and initial glycerol concentration. The experiments were performed in flasks with 500 mL capacity containing 100 mL of mineral medium with glycerol, under agitation of 150 rpm at a temperature of 30°C ± 1°C, samples were made in 24 hr, 48 hr and 72 hr. The production of biossurfactant was monitored through the index of aviation kerosene emulsification, consumption of glycerol, decreased surface tension and final biomass produced in cell-free broth, reaching a value of 75% in the index of aviation kerosene emulsification with 72 hours of fermentation. Results showed that the independent variables that best results obtained were pH 7.0, initial glycerol concentration 50 g / L and initial biomass concentration of 6.3 $x10^{-5}$ g/L. With parameters optimized experiments were performed in a fermentors of 2L and 3L capacity and the produced biosurfactant was recovered in a yield of 0.68 biosurfactating/g of glycerol. After recovery the biosurfactant was purified to about 90% as confirmed by thermogavimetric analysis (TGA). Stability tests were performed diferent temperatures and salinities, calcium tolerance test, index of aviation kerosene emulsification, test of different raw materials (hexane biodiesel, olly sludge, aviation kerosene) as well as characterization through spectrometric analysis(FTIR), reometer analysis and sugar analysis.The results indicated the possible formation of a stable rhamnolipid in a different temperatures and salinities that emulsify a aviation kerosene in a solution of 100 mg/L of $CaCO_3$. The sugar analysis revealed the formation of a biosurfactant with neutral sugars such as rhamnose (19%), mannose (35%), galactose (2%) and glucose (44%).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama de blocos genérico da produção de biodiesel e da purificação do glicerol (RIVALDI *et al*, 2008) 12

Figura 2 (a) Reação global; (b) Reações consecutivas de transesterificação de triglicerídeos. R1, R2, R3 e R representam grupos alquilas (RIVALDI *et al*, 2008) 19

Figura 3 Principais setores industriais de utilização de glicerina (MOTA, da SILVA e GONÇALVES, 2009) 20

Figura 4 Estruturas típicas de biossurfatantes. (a) Quatro estruturas diferentes de ramnolipideos por *Pseudomonas aeruginosa* (b) Soforose lipídeo por *C. bombicola* (MULLIGAN, 2005) 27

Figura 5 As descobertas da camada pré-sal na Bacia de Santos (LIMA, 2011) 36

Figura 6 Fermentador utilizado nos experimentos, capacidade de 2L, modelo Multigen marca New Brunswick Scientific Co. (New Jersey, EUA) 43

Figura 7 Fermentador utilizado nos experimentos, capacidade de 3L, New Brunswick Scientific modelo Bio Flo/Celligen 115 (New Jersey, EUA) 44

Figura 8 Índice de emulsificação para querosene de aviação em função do tempo de fermentação para cada experimento. IE meio = 0,2% 54

Figura 9 Consumo de glicerol por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 em função do tempo de fermentação para cada experimento 56

Figura 10 Crescimento celular de *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 em função do tempo de fermentação para cada experimento 58

Figura 11 Diminuição da tensão superficial por *Pseudomonas aeruginosa* em função dos experimentos. TS meio = 64,5 mN/m 59

Figura 12 Representação esquemática para os resultados obtidos para o índice de emulsificação para querosene de aviação 61

Figura 13 Gráfico de perturbação para o índice de emulsificação para querosene de aviação. 3

Figura 14 Interação entre concentração de biomassa inicial e concentração inicial de glicerol para a variável de resposta do índice de emulsificação para querosene de aviação em pH 7,0. 65

Figura 15 Diagrama de Pareto mostrando a contribuição das variáveis estudadas para o índice de emulsificação. 5

Figura 16 Representação esquemática para os resultados obtidos para o consumo de glicerol 66

Figura 17 Interação entre concentração inicial de biomassa e concentração inicial e glicerol para a variável de resposta consumo de glicerol em pH 7,0 68

Figura 18 Diagrama de Pareto mostrando a contribuição dos parâmetros estudados para o consumo de glicerol 69

Figura 19 Representação esquemática dos resultados experimentais pra diminuição da tensão superficial pH 7,0 70

Figura 20 Interação entre concentração inicial de biomassa e concentração inicial de glicerol para a variável de resposta diminuição da tensão superficial, com pH 7,0. 72

Figura 21 Diagrama de Pareto mostrando a contribuição dos parâmetros estudados para a diminuição da tensão superficial 72

Figura 22 Interação entre concentração inicial de biomassa e concentração inicial de glicerol para a variável de resposta diminuição da tensão superficial 74

Figura 23 Diagrama de Pareto mostrando a contribuição dos parâmetros estudados para o crescimento celular. 75

Figura 24 Respostas estudadas em função do tempo de fermentação para *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109. Concentração inicial de glicerol = 50g/L; pH 7,0; inóculo inicial =6,2x10^{-5} g/L; Tensão do meio= 69 mN/m; Máximos em 72 horas: IE do querosene de aviação: 63%, DT: 29%; Xfinal: 1,29g/L e CG: 24% 76

Figura 25 Respostas estudadas em função do tempo de fermentação para *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109. Concentração inicial de glicerol = 50g/L; 7,0; inóculo inicial= 6,2x10^{-5} g/L; Tensão do meio= 69 mN/m. Máximos em 72 horas: IE do querosene de aviação: 72%, DT: 19%, CG: 60% . Máximo para Xfinal em 48 horas: 1,37 g/L. 78

Figura 26 Oxigênio dissolvido em função do tempo de fermentação para produção de biossurfatnte por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 79

Figura 27 Extratos de biossurfatante secos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* a partir de glicerol. 81

Figura 28 Tensão superficial em função da concentração de biossurfatante impuro (pH 7,0). 82

Figura 29 Efeito das diferentes concentrações de $CaCO_3$ no índice de emulsificação do querosene de aviação para soluções 4,0 g/L do biossurfatante impuro e purificado. 83

Figura 30 Efeito da autoclavagem no índice de emulsificação do querosene de aviação para soluções 4,0 g/L do biossurfatante impuro e purificado 84

Figura 31 Índice de emulsificação do querosene de aviação, biodiesel e hexano para soluções 4,0 g/L do biossurfatante impuro e purificado 85

Figura 32 Emulsificação do: (a) biodiesel; (b) hexano; (c) querosene de aviação (d) borra oleosa para soluções 4,0 g/L do biossurfatante impuro e purificado 85

Figura 33 Experimentos para o estudo do efeito da salindade e temperatura no índice de emulsificação do querosene de aviação 87

Figura 34 Probabilidade normal dos resíduos para o modelo do índice de emulsificação do querosene de aviação para solução do biossurfatante impuro 89

Figura 35 Carta simplificada das freqüências dos grupos funcionais mais comuns 91

Figura 36 Espectros FTIR de ramnolipídeos por Barali e Konwar (2011) 92

Figura 37 Espectros FTIR de amostras do extrato de biossurfatante impuro (a) e puro (b) em pastilhas de KBr 92

Figura 38 Curvas termogravimétricas do extrato de biossurfatnate impuro (a); purificado (b) e purificado com etanol a 4ºC±1ºC 94 e 95

Figura 39 Curvas de viscosidade para solução 4,0g/L de biossurfatante impuro (Am 2) e solução 4,0 g/L de biossurfatante purificado (Am 1). 30°C 96

Figura 40 Análise de açúcares do biossurfatante recuperado purificado de solução estoque de 6,0 g/L(a) e de biossurfatante recuperado purificado 97

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Origem de alguns polissacarídeos solúveis em água (RINAUDO, 2004) 24

TABELA 2 Tipo e origem microbiana de biosurfatantes (adaptado de MULLIGAN, 2005) 29 e 30

TABELA 3 Experimentos Realizados Segundo Planejamento Fatorial 2^3 41 e 42

TABELA 4 Determinação do índice de emulsificação em diferentes temperaturas e concentrações de NaCl 48

TABELA 5 Ensaio de tolerância ao cálcio 49

TABELA 6 Desenho experimental para o índice de emulsificação do querosene de aviação (IE) 54

TABELA 7 Desenho experimental para consumo de glicerol por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 (CG) 55

TABELA 8 Desenho experimental para crescimento celular (biomassa) de *Pseudomonas aeruginosa EQ 109* (Xf) 57

TABELA 9 Desenho experimental para diminuição da tensão superficial por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 (DT) 59

TABELA 10 Respostas máximas no tempo de 72 horas de fermentação 60

TABELA 11 ANOVA completa para todos os termos no índice de emulsificação para querosene de aviação 64

TABELA 12 ANOVA para todos os termos de consumo de glicerol por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 67

TABELA 13 ANOVA para todos os termos do modelo da diminuição da tensão superficial 71

TABELA 14 Matriz do planejamento fatorial 2^2 com três pontos centrais 86 e 87

TABELA 15 ANOVA para o índice de emulsificação do querosene de aviação para uma solução 4,0 g/L do biossurfatante impuro 89

Sumário

1 Introdução 2

2 Objetivos 5

3 Levantamento Bibliográfico 7

3.1 Uma Nova Visão para o Segmento Energético 7

3.1.1 Aspectos gerais 7

3.1.2 Biocombustíveis 8

3.1.2.1 Biodiesel 9

a) *Conceitos iniciais* 9

b) *Motivação para o uso do biodiesel* 10

c) Processos de produção 11

d) Biodiesel no mundo 15

e) Biodiesel no Brasil 16

f) Fatores críticos 17

3.1.3 Glicerol 17

3.2 Polissacarídeos 23

3.3 Surfatantes e Biossurfatantes 25

3.4 O Importante Papel de *Pseudomonas aeruginosa* na Produção de Biossurfatantes 32

3.5 Aplicações Industriais para os Biossurfatantes: Recuperação Avançada de Petróleo e a Era Pré-Sal 35

3.6 Vantagens do Tratamento Estatístico e da Caracterização 37

4 Metodologia 40

4.1 Micro-organismo para Produção de Biossurfatante 40

4.2 Meio de cultura 40

4.3 Experimentos 40

4.3.1 Análise da Influência do pH, da Concentração Inicial de Biomassa e da Concentração Inicial de Glicerol Utilizando um Planejamento Experimental 2^3 para a Produção de Biossurfatante por Pseudomonas aeruginosa EQ 109 40

a) Preparo do Inóculo 40

b) Desenho Experimental 40

4.4 Produção de Biossurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 em Fermentador: Fase I 42

5 Produção de Biossurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 em Fermentador: Fase II 43

4.6 Recuperação e Purificação do Biossurfatante 44

4.7 Determinações Analíticas 45

4.7.1 Índice de Emulsificação ou Atividade Emulsificante 45

4.7.2 Tensão Superficial 45

4.7.3 Determinação da Biomassa 45

4.7.4 pH 46

4.7.5 Dosagem de Glicerol 46

4.8 Caracterização do Biossurfatante Produzido por Análises Qualitativas e Quantitativas 46

4.8.1 Determinação da Concentração Micelar Crítica 46

4.8.2 Determinação do Índice de Emulsificação em Diferentes Temperaturas e Concentrações de NaCl 47

4.8.3 Ensaio de Tolerância ao Cálcio 47

4.8.4 Ensaio de Índice de Emulsificação de Diferentes Matérias-Primas 49

4.8.5 Ensaio de Resistência a Autoclavagem 49

4.8.6 Análise Espectrofotométrica na Região do Infravermelho com Transformada de Fourrier (FTIR) 49

4.8.7 Análise Termogravimétrica (TG) 49

4.8.8 Análise de Açúcares 50

4.8.9 Análise Reológica 51

5 Resultados e Discussão 53

5.1 Avaliação das Variáveis de Resposta para o Teste com *Pseudomonas aeruginosa* em Função do Tempo de Fermentação 53

5.1.1 Índice de Emulsificação 53

5.1.2 Consumo de Glicerol 55

5.1.3 Crescimento Celular (biomassa final) 56

5.1.4 Diminuição da Tensão Superficial 58

5.2 Análise Estatística dos Dados 60

5.2.1 Índice de Emulsificação 61

5.2.2 Consumo de Glicerol 66

5.2.3 Diminuição da Tensão Superficial 69

5.2.4 Crescimento Celular (biomassa final) 74

5.3 Precipitação com Etanol: Análise qualitativa 75

5.4 Produção de Biossurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 em Fermentador: Fase I 75

5.5 Produção Biossurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 em Fermentador: Fase II 77

5.6 Caracterização do Biossurfatante 80

5.6.1 Propriedades Físicas 80

a) Características 80

b) Concentação Micelar Crítica 81

c) Tolerância ao Cálcio 82

d) Resistência a Autoclavagem 84

e) Índice de Emulsificação de Diferentes Matérias-Primas 84

f) Estabilidade em Diferentes Salinidades e Temperaturas 86

f.1) Solução de Biossurfatante Impuro 88

f.2)Solução de Biossurfatante Puro 90

5.6.2 Análises Instrumentais 90

a) Análise Espectrométrica no Infra-Vermelho com Transformada de Fourrier (FTIR) 90

b) Análise Termogravimétrica (TG) 93

c) Análise Reológica 95

5.6.3 Determinação da Composição Monossacaridica 96

6 Conclusões e Sugestões 98

Referências 101

CAPÍTULO 1

Introdução

A indústria petrolífera tem buscado caminhos alternativos para a produção de energia e a possibilidade de esgotamento e escassez dessas fontes fósseis, ainda nesse século, é uma das problemáticas a ser questionadas, como a poluição decorrente da emissão de gases (CO_2, NO_x, SO_2 etc.), agravando o efeito estufa e, consequentemente, causando problemas ambientais (RÍO e BURGILLO, 2009).

O biodiesel veio suprir parte das expectativas do segmento energético. Diversas são as fontes renováveis que podem ser utilizadas para a fabricação do biodiesel, como qualquer óleo vegetal novo ou usado. Quando estes óleos ou gorduras reagem quimicamente com o álcool etílico ou o metanol, estimulados por um catalisador, resultam em um combustível de alta qualidade que substitui o óleo diesel, sem necessidade de modificação do motor (VICENTE; MARTÍNEZ; ARACIL, 2007).

A glicerina "loira" (nome dado devido ao seu aspecto amarelado), um *co-produto* da produção de biodiesel, tem gerado discussões quanto ao seu aproveitamento, já que a oferta deste co-produto aumentou significativamente devido à inserção do biodiesel no mercado mundial. Por este motivo, é necessário buscar novas aplicações e soluções que venham compatibilizar a produção deste biocombustível com a alta oferta do glicerol, componente principal da glicerina "loira". A produção de biossurfatantes a partir de glicerol é uma alternativa promissora, pois estes são menos tóxicos ao ambiente que os produzidos quimicamente.

Os surfatantes por apresentarem propriedades tensoativas e emulsificantes têm diversas aplicações no setor do petróleo, como na prospecção e transporte; na limpeza de tanques de armazenamento e na biorremediação de áreas contaminadas com petróleo ou seus derivados. Podem ser utilizados para diminuir a tensão superficial, aumentar a solubilidade, o poder de detergência e a capacidade espumante. As indústrias petrolíferas são uma das que mais utilizam os benefícios dos surfatantes, principalmente, para aumentar a solubilidade dos componentes do petróleo (BOGNOLO, 1999; SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007).

Muitos biossurfatantes são do tipo não-iônicos (neutros), aniônicos e poucos são catiônicos. Estes compostos apresentam moléculas anfifílicas possuindo uma

porção hidrofílica e outra lipofílica. A porção lipofílica da molécula é formada por longas cadeias de ácidos graxos e a porção hidrofílica pode ser um aminoácido, peptídeo, hidróxido, fosfato, grupo carboxílico ou carboidrato (BOGNOLO, 1999). Uma variedade de micro-organismos pode produzir biossurfatantes a partir de açúcar, óleos e alcanos e a maioria é produzida em condição de aerobiose e em meio aquoso (MULLIGAN, 2005).

Um dos compostos biossurfatantes mais investigados são os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*. Ramnolipídeos são glicolipídeos formados por uma ou duas ramnoses e uma moléculas de ácido graxo hidrofóbico. Possuem um excelente poder emulsificante e podem atuar em uma grande variedade de hidrocarbonetos, compostos aromáticos e óleos vegetais. Com isto, as aplicações para estas substâncias é bastante ampla desde medicamentos para uso tópico até o tratamento de áreas impactadas com óleo (LOVAGLIO *et al*, 2011).

Associando a necessidade de compatibilizar a oferta de glicerol com a produção de bioprodutos de alto valor agregado, o estudo tem como objetivo principal a utilização de glicerol como única fonte de carbono para a produção de biossurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* EQ109

CAPÍTULO 2

Objetivos

2.1 Objetivo geral

Esta tese propõe produzir um biossurfatante a partir da utilização de glicerol, como principal fonte de carbono e energia por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109, pois foi verificado que na literatura existem alguns trabalhos relacionados à produção de biossurfatante por *Pseudomonas* sp a partir de glicerol, entretanto nenhum deles enfatiza o desenvolvimento de uma tecnologia para produção de biossurfatante visando o aumento da produção de óleo em poços de petróleo, sejam eles novos ou já em processamento. Para isto, o produto deve apresentar boas propriedades, tais como: compatibilidade com outros polímeros, estabilidade em altas salinidades e em altas temperaturas.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar a influência de diversos valores de temperatura, pH, teor inicial de células na formação de biossurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 e suas possíveis interações;
- Produzir o biossurfatante em fermentador utilizando os parâmetros de maior influência estudados no item anterior;
- Recuperar o biossurfatante obtido como extrato e sua purificação;
- Estudar a estabilidade do extrato recuperado em elevadas temperaturas e salinidades;
- Caracterizar físico-quimicamente e instrumentalmente o extrato.

CAPÍTULO 3

Levantamento Bibliográfico

3.1 Uma Nova Visão para o Segmento Energético

3.1.1 Aspectos gerais

Atualmente, em grande parte do mundo há uma preocupação em aliar o crescimento econômico com a preservação do meio ambiente, visando garantir para as futuras gerações um ambiente saudável e equilibrado por meio do desenvolvimento sustentável (LUCION *et al*, 2006).

Fontes renováveis de energia seguem a visão da sustentabilidade, pois são capazes de suprir as necessidades da geração atual sem comprometer as gerações futuras contribuindo com a diminuição de emissões de poluentes. Para isto, um empreendimento deve atender a quatro requisitos básicos: ser ecologicamente correto, economicamente viável, socialmente justo e culturalmente aceito (GARCEZ e VIANNA 2009; DEMIRBAS, 2009).

Quando se fala a respeito de recursos energéticos é importante ressaltar que 80,3% da energia consumida no mundo vêm de combustíveis fósseis, sendo 57,7% deste total utilizado pelo setor de transporte (ESCOBAR *et al*, 2009).

A emissão de gases na atmosfera está intimamente ligada ao processo de combustão de motores diesel, onde os principais agentes poluidores são NO_x e material particulado, que podem contribuir para o desenvolvimento de câncer, induzir efeitos sobre a saúde cardiovascular e respiratória; promover poluição do ar, da água e do solo; reduzir a visibilidade e alterar o clima global (ÖNER e ALTUN, 2009). Devido a isto, surge a necessidade do desenvolvimento e da aplicação de tecnologias ambientais limpas que agregam muitos benefícios, dentre eles o gerenciamento de resíduos e a redução das emissões (DOVI *et al*, 2009).

É necessário intensificar os estudos nestas tecnologias para todos os biocombustíveis e avaliar quais são as melhores opções para o ambiente (PONTON, 2009).

3.1.2 Biocombustíveis

As estatísticas atuais para a produção global de biocombustíveis alcançaram o nível recorde de 34 milhões de toneladas em 2007 correspondendo a 1,5% do total de combustíveis consumidos em estradas de rodagem, sendo que a Agência Internacional de Energia (IEA) prevê um aumento para 5% até o final de 2030 (WEC, 2010).

As estratégias de implantar os biocombustíveis no mercado mundial dependem de fatores como a adequação aos mecanismos dos motores, quer sejam veiculares ou não, principalmente devido às diferentes propriedades de cada um deles, dos impactos ambientais causados pela produção e uso e da logística de distribuição.

A pesquisa de fontes renováveis no Brasil e Estados Unidos têm crescido significativamente, porém países como Cuba e Venezuela colocam em dúvida os aspectos promissores destas fontes, pois estas poderiam intensificar a produção em áreas antes destinadas ao cultivo de alimentos aumentando as diferenças sociais, sobretudo na América Latina (SUAREZ *et al*, 2009).

O potencial de produção de etanol a partir de resíduos da agricultura foi avaliado por Najafi *et al* (2009). Os autores relatam a importância dos biocombustíveis no Irã, país onde foi desenvolvida a pesquisa. O estudo prevê que neste país a produção de petróleo pode atingir 6,8 mbd (milhões de barris dia) em 2030, porém além da necessidade de uma grande infra-estrutura para geração de eletricidade na produção, o Irã precisa importar gasolina para seu consumo interno. Com isto os biocombustíveis acabam sendo uma opção adequada. Foi investigada a produção de etanol a partir de resíduos do cultivo de arroz, cevada, cana-de-açúcar, milho e trigo, sendo que este último obteve o melhor rendimento (0,9 bilhões de galões por ano).

A pesquisa mundial em biocombustíveis tem aumentado ao longo dos anos (LI *et al*, 2009) como na Suécia e Holanda (ULMANEN;VERBONG; RAVEN,2009), na China (XUAN *et al*, 2009; YANG *et al*, 2009, YAN e CROOKES, 2009) e em países comunistas como Bulgária, Romênia e Cazaquistão (SREBOTNJAK e HARDI,

2011). O Brasil é referência mundial em produção de etanol e avança também para ser um grande potencial na fabricação de biodiesel (WEC, 2010).

3.1.2.1 Biodiesel

a) Conceitos iniciais

O petróleo, assim como todos os seus derivados, possui um papel importante em todas as áreas da sociedade, porém os altos preços e o impacto ambiental têm intensificado o debate entre várias organizações internacionais quanto à produção de biocombustíveis, como o biodiesel (BASHA; GOPAL; JEBARAJ, 2009; ESCOBAR *et al*, 2009).

A definição para biodiesel adotada na Lei nº 11.097, de 13 de setembro de 2005, que introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira é:

"Biodiesel: biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil" (http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/2698.html).

O biodiesel é um biocombustível produzido a partir de óleos e gorduras, vegetais ou animais. Em virtude das estruturas moleculares pouco ramificadas, alguns óleos naturais podem ser utilizados como combustíveis devido ao seu alto poder calorífico, cerca de 80% em relação ao diesel de petróleo. Contudo, a maioria dos óleos vegetais apresenta viscosidade dez vezes maior que o petrodiesel e por isso há a necessidade de conversão destes óleos em produtos com menores viscosidades (NIKIEMA e HEITZ, 2008).

Comercialmente é feita uma mistura do diesel com biodiesel em diferentes proporções e são chamadas de B5, B20 ou B100, onde os valores numéricos representam a % v/v de biodiesel presente na mistura (JANAUN e ELLIS, 2010). Atualmente, esta mistura já alcançou 5% na Europa, chegando a 30% na Alemanha, e 5% no Brasil. Espera-se que no Brasil, em 2012, esta porcentagem aumente para 7% até 10%, conforme declaração do diretor da Agencia Nacional de Petróleo, Gás

Natural e Biocombustíveis, Allan Kardec (http://www1.folha.uol.com.br/ambiente/876379-mistura-de-biodiesel-no-diesel-convencional-pode-aumentar.shtml).

b) Motivação para o uso do biodiesel

A redução de emissões gasosas tóxicas no meio ambiente é uma das principais razões para o uso do biodiesel, além da questão de inclusão social de agricultores de baixa renda. Além disso, ele pode ser utilizado sem modificação dos motores, é biodegradável, possui baixas concentrações de enxofre e aromáticos, alta combustão, dentre outros aspectos (ATADASHI, AROUA, AZIZ; 2010; CORONADO *et al*, 2009).

Muñoz *et al* (2011) verificaram que o biodiesel aumenta a lubricidade de novos combustíveis diesel com baixos teores de enxofre. Lubricidade pode ser definida como a capacidade de um determinado composto de prevenir o desgaste quando duas superfícies entram em contato. O teste se baseia em verificar o dano causado por um esfera de 6 mm em um disco de aço que contém a amostra. Para este teste a adição de apenas 100 ppm de biodiesel ao diesel (sem aditivos) obteve um desgaste 338 milímetros, resultado apropriado para motores diesel. Os autores também fizeram testes de compatibilidade de diferentes misturas diesel/biodiesel com elastômeros em diferentes temperaturas (50^0C e 90^0C) e com motores, onde o biodiesel se mostrou uma ótima adaptação.

Rehman, Phalke e Pandey (2011), utilizaram misturas de biodiesel de pinhão-manso/diesel como combustível em uma turbina a gás. Os autores relatam que existem muitos estudos a respeito do desempenho deste combustível em motores de combustão interna, porém em turbinas a gás a pesquisa é escassa. Foram comparadas as performances do diesel, biodiesel e de duas misturas, uma contendo 15% de biodiesel (b1) em diesel e outra 25% (b2). As misturas obtiveram melhores resultados em relação ao diesel quanto às emissões gasosas de CO e hidrocarbonetos. Além disso, o óleo de pinhão-manso tem características próximas ao diesel que são aprimoradas com a esterificação, processo este que transforma o óleo em biodiesel.

Kegl (2007) estudou os efeitos do biodiesel nas emissões oriundas de motores diesel de ônibus e verificou, dentre outras, as características da injeção no motor com o objetivo de diminuir as emissões de gases tóxicos. Os resultados indicaram que, com o uso do biodiesel, um tempo curto de injeção é essencial para reduzir os gases emitidos.

c) Processos de produção

A conversão dos óleos em biodiesel pode ser feita por vários processos, mas o principal é a reação de transesterificação (LEUNG; WU; LEUNG, 2010) quer seja ácida (HAN *et al* 2009) ou básica (ABREU *et al*, 2004) utilizando diferentes tipos de catalisadores químicos (KAUR e ALI, 2011; TANG *et al*, 2011) ou enzimáticos (HAMA *et al*, 2011; ROBLES-MEDINA *et al*, 2009; MA e HANNA, 1999). Outros processos têm sido descritos na literatura como a hidro-esterificação (de SOUSA *et al*, 2010; SUAREZ *et al*, 2009), a esterificação (CARMO Jr. *et al*, 2009) e interesterificação (XU; DU; LIU, 2005). Um diagrama de blocos com o processo comumente utilizado está representado na Figura 1.

Diversas são as fontes renováveis que podem ser utilizadas para a fabricação do biodiesel, destacando-se óleos vegetais (PATIL e DENG, 2009) *in natura* (NABI; RAHMAN; AKHTER, 2009) ou usados (de SOUZA *et al*, 2009) e restos de gordura animal (ONER e ALTUN, 2009). Quando estes óleos ou gorduras reagem quimicamente com o álcool etílico ou o metanol, estimulados por um catalisador, resulta um combustível de alta qualidade que substitui o óleo diesel fóssil sem necessidade de modificação do motor (MORÓN-VILARREYS *et al*, 2007; VICENTE; MARTÍNEZ; ARACIL, 2007).

A literatura tem descrito que os processos de produção de biodiesel podem ser realizados em diferentes tipos de reatores. Behzadi e Farid (2009) investigaram a produção de biodiesel utilizando um reator contínuo gás-líquido onde o óleo ou gordura aquecidos e atomizados entravam em contato com vapor de metanol em contracorrente no reator. Os autores alcançaram conversões de 94-96% de biodiesel em seus experimentos, operando com 5-7 g de metóxido de sódio/L de metanol em uma vazão de 17,2 L/h e de óleo de 10 L/h. O sucesso da conversão foi atribuído ao

processo de atomização que aumenta a área de contato do metanol com o óleo ou a gordura, às elevadas temperaturas de reação e ao reciclo de metanol.

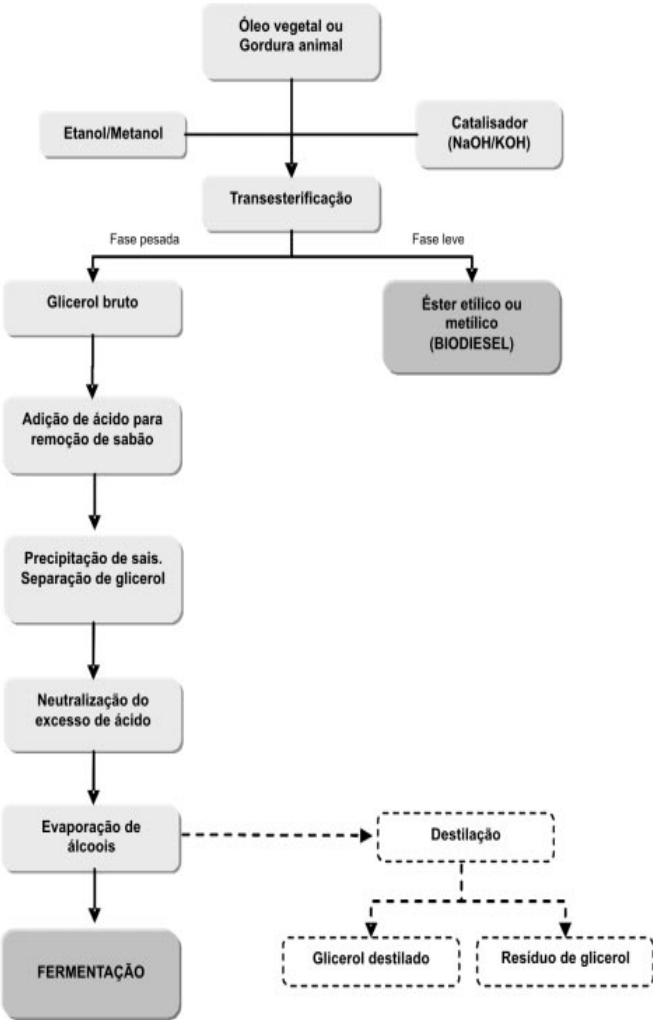


Figura 1 Diagrama de blocos genérico da produção de biodiesel e da purificação do glicerol (RIVALDI *et al* 2008).

Um processo contínuo também foi utilizado por Chongkong, Tongurai, Chetpattananondh (2009), além de um processo em batelada. Os autores verificaram que a esterificação contínua para a produção de biodiesel de destilado de ácido palmítico (resíduo da produção deste ácido graxo), gerou um processo econômico e um biodiesel de alta qualidade apresentando a maioria das propriedades em conformidade com padrões internacionais.

Shibasaki-Kitakawa *et al* (2007) utilizaram diferentes resinas de troca iônica como catalisador heterogêneo na produção de biodiesel. O processo foi conduzido

de maneira contínua e batelada empregando trioleina 99%, etanol e diferentes resinas para produzir etil-oleato (biodiesel). Os autores constataram que a resina de troca aniônica de menor densidade e menor tamanho de partícula obtiveram a melhor taxa de conversão. Verificou-se que para o processo em batelada o uso da combinação de um método de regeneração da resina em três passos fez com que a atividade catalítica não fosse perdida. O processo contínuo obteve elevados rendimentos quando empregado um reator com leito fixo empacotado com a resina.

A cinética e os processos de síntese de biodiesel têm sido muito estudados, a fim de diminuir os custos de produção. Di Serio *et al* (2005) realizaram síntese de biodiesel usando catalisadores ácidos de Lewis. Os autores estudaram os catalisadores mais ativos (sais carboxílicos de Cd, Mn, Pb, Zn) e foi feita uma correlação das atividades com a acidez do cátion. A atividade do melhor catalisador $Pb(CH_3COO)_2$ foi reduzida pela água formada durante a esterificação, entretanto com uma baixa concentração de catalisador (4×10^{-4}:1 razão em peso de catalisador para o óleo) foi possível a obtenção de uma produtividade elevada (96%), uma baixa concentração final de ácidos graxos livres (<1%) e um tempo de reação relativamente curto (200 min).

Vários parâmetros devem ser levados em consideração em um processo de produção. Eevera, Rajendran, Saradha (2009) realizaram a otimização e a caracterização do processo de produção de biodiesel no intuito de avaliar a adequação do produto em várias condições ambientais. Óleos vegetais comestíveis (coco, palma, amendoim e farelo de arroz) e de não comestíveis (noz de karanja, semente de amargosa e de algodão) foram utilizados para otimizar as variáveis do processo de formação de biodiesel, tais como: concentração do catalisador; quantidade necessária de metanol para a reação; tempo de reação e temperatura de reação. Os autores verificaram que a adição de excesso de catalisador causa maior participação de triglicerídeos na reação de saponificação; o processo de produção de biodiesel é incompleto quando a quantidade de metanol é inferior ao valor ótimo, quando a temperatura aumenta além do nível ótimo o rendimento do éster diminui devido à aceleração do processo de saponificação de triglicerídeos; o excesso no tempo de reação favorece a reação inversa de transesterificação que resulta em uma redução no rendimento de éster. As condições ótimas de reação para a

produção de metil-ésteres a partir de óleos comestíveis foram as seguintes: o tempo de reação de 90 min a 50 º C, 180 mL de metanol para 1000 mL de óleo e 1,5% NaOH como catalisador. Para os não-comestíveis os parâmetros ótimos são semelhantes a óleos comestíveis, exceto para a quantidade de metanol (210 mL/1000 mL de óleo).

Aliske *et al* (2006) estudaram a concentração de biodiesel em uma mistura de óleo diesel. Os autores apresentaram um método de medida que cobre uma larga faixa de misturas (0-100%) de biodiesel em óleo diesel, utilizando espectrofotometria de infravermelho e verificaram um pico de absorção para a carbonila (C=O) que estava presente somente no biodiesel, tornando possível a medida dos percentuais, mesmo em baixas concentrações, melhorando o controle de qualidade.

Algumas tecnologias têm sido propostas para minimizar o custo da produção deste biocombustível, seja em meios ácidos, básicos, a partir de microalgas (CHISTI, 2007) ou com a contribuição de enzimas como as lipases (ANTCZAK *et al*, 2009; DIZGE *et al*, 2009). O Brasil está desenvolvendo várias tecnologias onde a lei brasileira ajustou os percentuais do biodiesel misturados ao óleo diesel em 2% até 2008 e a 5% a partir de 2013 (ALISKE *et al*, 2006; TORRES *et al*, 2006). Atualmente este percentual é de 4%, sendo previsto também o aumento para 5% já para o início de 2010 (GARCIA, 2009, *online)*.

Marchetti, Miguel e Errazu (2007) fizeram uma revisão dos possíveis métodos de produção do biodiesel como a tradicional transesterificação de óleos ou gorduras utilizando: catálise alcalina, catálise ácida, lipase como catalisador e diferentes alcoóis. Todos os processos são viáveis, porém o mais econômico foi o processo de catálise ácida.

Keskin, Guru e Altıparmak (2007) avaliaram os efeitos de aditivos no consumo e nas emissões de um combustível feito com 60% biodiesel (proveniente de óleo de pinheiro) e 40% de óleo diesel enriquecido com aditivos de manganês e níquel. Os autores verificaram que estes aditivos metálicos aumentaram o consumo em 6%, entretanto a emissão de CO e a opacidade da fumaça decresceram por volta de 64% e 30% respectivamente, além de baixas emissões de NO_x.

Lapinskienė, Martinkus e Rėb¸daitė (2006) tiveram como objetivo determinar a toxicidade de diesel e biodiesel através da medida da biodegradação destes materiais em um solo aerado. Os resultados indicaram que o óleo diesel tem propriedades tóxicas em concentrações acima de 3%(p/p), enquanto o biodiesel não apresentou toxicidade em concentrações até 12% (p/p), devido ser mais facilmente biodegradado.

A mistura do biodiesel com o diesel aumenta as propriedades de lubrificação e a biodegradabilidade, reduz as emissões de gases tóxicos e a necessidade de manutenção do motor, aumentando sua vida útil.

d) Biodiesel no mundo

A produção mundial de biocombustíveis aumentou em 70% nos últimos dois anos. Nos Estados Unidos, Brasil e Europa a produção é elevada. Enquanto no Brasil e nos Estados Unidos o bioetanol é o biocombustível dominante, na Europa o biodiesel conta com mais de 80% da produção total de biocombustíveis ocasionando o aumento do debate a respeito do uso de sementes que servem de alimentos *versus* a produção de biodiesel, principalmente quanto à produção a partir de óleos de consumo humano (JANAUM e ELLIS, 2010; KAJARSTAD e JOHNSSON, 2009; SRINIVASAN, 2009).

Atualmente a líder mundial em produção de biodiesel é a Alemanha chegando a 2,6 milhões de toneladas principalmente a partir da semente de colza (http://sustentabilidade.allianz.com.br/?203/Perfil-da-bioenergia-preservando-a-natureza).

Mulugetta (2009) avaliou os aspectos econômicos do biodiesel na África sub-saarica, tendo como foco a produção de combustíveis de óleo de palma, mamona e pinhão-manso em Gana, Quênia e Tanzânia, respectivamente. Os resultados mostraram que o óleo de palma foi ligeiramente melhor que o pinhão-manso e a mamona foi considerada a pior matéria-prima. A razão para isto foi que o rendimento por hectare do óleo de palma foi significativamente mais elevado que os outros dois. Além disto, o subproduto proveniente da extração do óleo de palma pode ser utilizado como alimento para animais e como fertilizante, enquanto que os

provenientes do processamento do pinhão-manso e da mamona, somente têm aplicação como adubo. Apesar disto, a utilização do pinhão-manso pode ser interessante, tendo em vista que a planta pode crescer em variadas condições climáticas e pedológicas.

Na Espanha, Del Rio e Burguilo (2009) analisaram o impacto de energias renováveis na sustentabilidade. Os autores avaliaram energia proveniente do vento, do sol e do biodiesel. Segundo eles, a Espanha ocupa o quinto lugar em produção de biodiesel na Europa, depois da Alemanha, França, Itália e Inglaterra. Apesar disto, obteve um crescimento na produção deste biocombustível de 5000% nos últimos dois anos onde apenas 40% são consumidos no país.

Na Tailândia, as iniciativas e o potencial da produção de biodiesel foram revistos por Siriwardhana, Opathella e Jha (2009). Os autores relatam que o plano do governo é aumentar a utilização de biodiesel de 365 milhões de litros em 2007 para 3100 milhões de litros até 2012.

e) Biodiesel no Brasil

O Brasil tem se consolidado como uma nação auto-suficiente na produção de petróleo e com a descoberta de novas reservas, pode também se tornar um potencial exportador do óleo cru, no entanto, em virtude da necessidade de redução das emissões gasosas e a oportunidade de combater a má distribuição de renda, a produção de biodiesel pode atender às expectativas. Para isto, uma grande cadeia de produção de biodiesel está sendo desenvolvida baseada na agricultura familiar, contribuindo tanto para a redução do aquecimento global como para a geração de emprego e renda no campo.

Adicionalmente, o país está ocupando um lugar de destaque no que diz respeito ao conhecimento da tecnologia vinculada a produção de biodiesel e a pesquisa de novos insumos.

Garcez e Vianna (2009) estudaram a política brasileira em relação ao biodiesel, levando em consideração os aspectos ambientais e sociais envolvidos na sustentabilidade. Foram discutidas as perspectivas do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) lançado oficialmente em 6 de dezembro de

2004. Através do grupo de trabalho interministerial para biodiesel (GTIB), foi avaliada a *viabilidade* da utilização de óleo vegetal (biodiesel) como fonte de energia alternativa sugerindo políticas futuras, segundo um decreto do Presidente em exercício Luis Inácio Lula da Silva. Os autores criticaram o uso da palavra viabilidade que não é sinônimo de sustentabilidade. Foi ainda discutido o fato do decreto não mencionar os óleos residuais como matérias-primas para a produção do biodiesel, apesar de indicar a necessidade da expansão da agricultura familiar no Brasil, a qual ainda está limitada aos produtores de grãos.

f) Fatores críticos

É necessário levar em consideração vários fatores para que se possam avaliar os benefícios da produção de biodiesel, tais como: a matéria-prima utilizada na fabricação, a logística da distribuição, as tecnologias de obtenção e o estudo dos resíduos gerados durante todo o processo.

Há uma crescente preocupação quanto à ocupação de áreas de florestas, ou antes, destinadas a produção de alimentos. Devido a este fato, outras oleaginosas têm sido testadas como a mamona e o pinhão-manso, pois estas têm baixo impacto na produção de alimentos e podem se adaptar muito bem em regiões semi-áridas, ideal para o Brasil (SUAREZ *et al*, 2009).

Cesar e Batalha (2010) relatam que a produção de biodiesel a partir de óleo de mamona está encontrando muitas dificuldades, dentre elas a baixa produtividade, o manuseio inadequado e a influência de intermediários na cadeia de produção. Além disto, os autores afirmam que a produção de biodiesel a partir do óleo de mamona é inviável no Brasil no curto prazo e parece ser uma possibilidade muito distante futuramente.

3.1.3 Glicerol

A introdução do biodiesel na matriz energética de vários países fez com que um co-produto da fabricação deste biocombustível, o glicerol, tivesse sua oferta aumentada significativamente face à demanda do mercado mundial, acarretando queda de preços (PACHECO, 2004).

Para atender à demanda interna da adição obrigatória de 5% de biodiesel ao diesel comum, o Brasil produzirá 2,6 milhões de toneladas do biocombustível por ano, gerando quase 300 mil toneladas de glicerol, sendo que em 2004, antes da queda de preços, a produção foi de 800 mil toneladas do co-produto. Buscam-se novas aplicações para o glicerol no mundo. Na Europa não se tem mais como estocar o produto e várias indústrias estão queimando o glicerol em caldeiras para geração de energia térmica (http://www.biodieselbr.com/biodiesel/glicerina/biodiesel-glicerina.htm).

O glicerol é um poliálcool sendo este termo utilizado somente ao composto puro, 1,2,3-propanotriol, enquanto o termo glicerina aplica-se para purificação de compostos comerciais que contém normalmente quantidades maiores ou iguais a 95% de glicerol (de ARRUDA; RODRIGUES; FELIPE, 2007). Pode ser, portanto, aplicado a uma ampla variedade de produtos utilizados nas indústrias de cosméticos, farmacêutica, petroquímica e de alimentos (KNOTHE *et al*, 2006).

Na fabricação de biodiesel, o glicerol é um co-produto no processo. Um dos parâmetros importantes a serem avaliados na produção é a quantidade deste co-produto dissolvido no biocombustível, o qual acarreta corrosão dos equipamentos. Para isto a pesquisa tem se intensificado para aumentar a pureza do biodiesel, seja através de membranas cerâmicas para microfiltração (GOMES; PEREIRA; de BARROS, 2010), membranas poliméricas (SALEH; TREMBLAY; DUBÉ, 2010) ou via neutralização química e saponificação (HÁJEK e SKOPAL, 2010). A Figura 2 mostra resumidamente as reações que ocorrem no processo (RIVALDI *et al*, 2008).

A RESOLUÇÃO ANP Nº 7, DE 19.3.2008 - DOU 20.3.2008, determina que a quantidade limite de glicerol (% em massa) livre em biodiesel seja de 0,02% e de glicerol total de 0,25%. Para isto investigam-se opções para a determinação analítica deste composto no biocombustível. Bansal *et al* (2008) adotaram a cromatografia em camada fina e análise de imagens para determinar a quantidade de glicerol em biodiesel. Os autores garantem que esta técnica é viável economicamente além de ser facilmente executável. Outros autores, como Bournay *et al*. (2005), produziram biodiesel através de um novo processo heterogêneo e obtiveram glicerol com 98% de pureza, límpido e incolor.

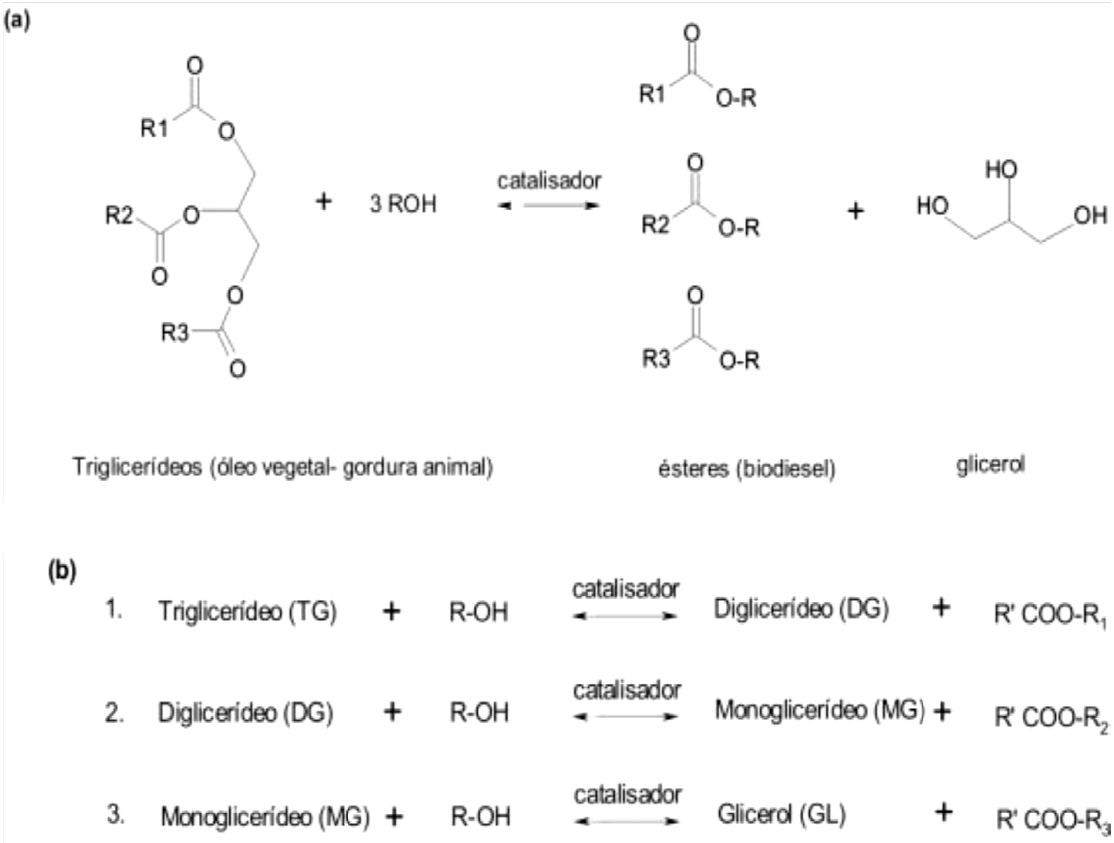


Figura 2 (a) Reação global; (b) Reações consecutivas de transesterificação de triglicerídeos. R1, R2, R3 e R representam grupos alquilas (RIVALDI *et al*, 2008)

O aumento da produção de biodiesel fez com que houvesse um excedente considerável de glicerol, causando um desequilíbrio econômico e acarretando queda de preço. O preço FOB (*Free On Board*) do glicerol bruto no Brasil varia de R$200,00/t a R$400,00/t, sendo o valor do glicerol “loiro” (parcialmente tratado para remoção de impurezas) de R$600,00/t a R$800,00/t (RIVALDI *et al*, 2008). Inicia-se uma preocupação com o excedente de glicerol e a projeção para 2013 é de 488 milhões L/ano. Devido a estes fatos procuram-se alternativas em transformar este co-produto em produtos com alto valor agregado, incluindo produtos obtidos de fermentação.

A glicerina (nome comercial do produto com pureza de 95%) tem seu uso em diversos campos da ciência e da indústria. A Figura 3 mostra algumas aplicações habituais desta matéria-prima.

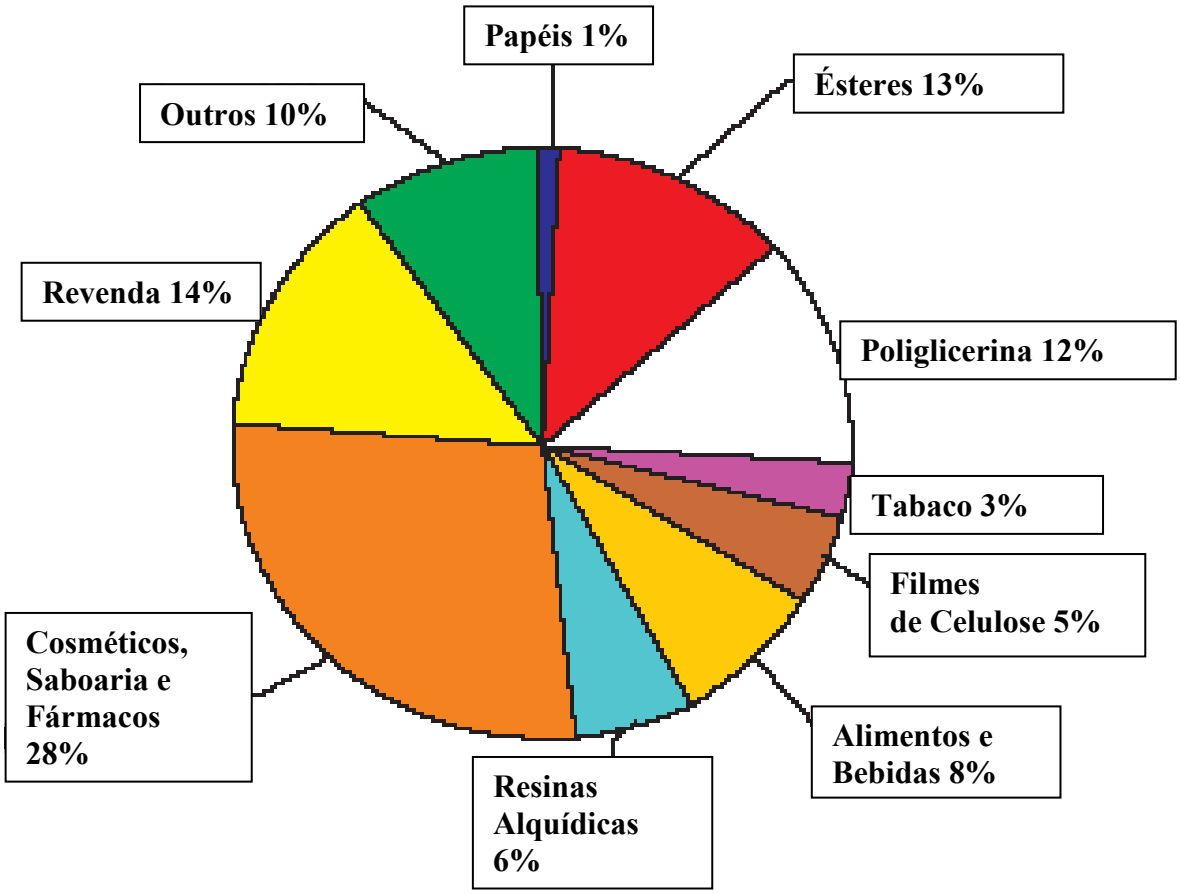


Figura 3 Principais setores industriais de utilização de glicerina (MOTA, da SILVA e GONÇALVES, 2009).

Chatzifragkou *et al* (2011) investigaram a capacidade de assimilação de glicerol por quinze micro-organismos eucarióticos para a conversão deste co-produto da fabricação de biodiesel em diferentes metabólitos. As cepas utilizadas foram: *Candida boidinii* ATTC 32195; *Candida curvata* NRRL-Y 1511; *Candida oleophila* ATCC 20177; *Candida* (*Metschnikowia*) *pulcherrima* LFMB 1; *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411; *Mortierella isabellina* MUCL 15102; *Mortierella ramanniana* MUCL 9235; *Mucor* sp. LGAM 365; *P. membranifaciens* LFMB 8; *Rhodotorula* sp. LFMB 6; *Rhodotorula* sp. LFMB 22; *T. elegans* CCF 1465; Y. lipolytica LFMB 19; *Zygosaccharomyces rouxii* LFMB 3; *Zygorhynchus moelleri* MUCL 1430. Segundo os autores as leveduras apresentaram uma maior produção de biomassa, sendo que apenas uma cepa acumulou lipídeo intracelularmente. As cepas *Zygomycetes* sp acumularam lipídeos dentro dos micélios e, de maneira geral, o glicerol foi um substrato adequado para a produção de ácidos orgânicos, polióis, proteína celular e ácido gamalinoleico (GLA) ou ômega-6.

O efeito de glicerol como fonte de carbono e energia única no crescimento e composição de ácidos graxos de *Rhodotorula glutinis* foi pesquisado por Easterling *et al* (2009). Os autores tiveram como objetivo determinar o efeito do glicerol sobre o crescimento de *Rhodotorula glutinis*; avaliar os efeitos do glicerol no acúmulo de lipídeos e determinar o efeito do uso de glicerol como uma fonte de carbono única ou secundária no conteúdo de metil-ésteres de ácidos graxos produzidos pela levedura. Foi demonstrado que o glicerol pode ser utilizado como fonte única de carbono ou pode ser combinado com outras fontes, tais como xilose e dextrose. Além disso, os resultados indicaram que a composição dos ácidos graxos foi afetada pela fonte de carbono utilizada, sendo o índice de ácidos insaturados de 53% com glicerol como fonte única e de 25% quando o substrato foi apenas xilose.

Os autores da Silva, Mack e Contiero (2009) avaliaram glicerol com o intuito de verificar sua potencialidade como uma abundante e promissora fonte de carbono em bioprocessos. O estudo fez uma revisão ampla da literatura a respeito da bioconversão de glicerol em produtos com alto valor agregado, tais como: 1,3 – propanodiol, di-hidroxiacetona, etanol, ácido cítrico, pigmentos, poli-alcanoatos e biossurfatantes. Para a produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol por cepas de *Clostridium* sp Cárdenas *et al* (2007) utilizaram 13 cepas diferentes. A cepa IBUN 13A foi capaz de produzir 1,3-propanodiol a partir de glicerol industrial sem purificação, com um rendimento ($Y_{p/s}$) de 0,951 $mol.mol^{-1}$.

Um grande interesse tem surgido em se produzir materiais plásticos biodegradáveis, porém o alto custo na produção destes polímeros limita a aplicação industrial. Com intuito de diminuir esta limitação, Cavalheiro *et al* (2009) avaliaram a produção de poli-hidroxialcanoatos (PHAs) por *Cupriavidus necator* a partir de resíduo glicerinoso (GRP) da indústria de biodiesel. O micro-organismo utilizado acumulou poli(3-hidroxibutirato) P(3HB), a partir de resíduo glicerinoso (GRP) e de glicerol comercial (PG), sendo este último utilizado como controle. Foram alcançadas produtividades entre 0,6 g de PHB/L.h e 1,5 g PHB/ L.h para o glicerol comercial com um conteúdo máximo celular em peso seco 82,5 g/L, sendo 62% P(3HB). Quando foi utilizado resíduo glicerinoso a produtividade final foi de 0,84g PHB/L.h com um conteúdo máximo celular em peso seco de 68,8 g/L e acumulação de 38% de P(3HB).

Imandi *et al* (2007) examinaram a produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* utilizando glicerol proveniente da fabricação de biodiesel e aplicaram o desenho experimental de Doehlert, pelo método de superfície de resposta, para desenvolver uma correlação matemática entre concentração de extrato de levedura, glicerol e solução salina tendo como resposta um valor máximo de produção. O método foi capaz de determinar a concentração ótima dos constituintes: extrato de levedura 0, 2682 g/L; glicerol: 54,4081 g/L; solução salina 13,6936 % v/v. Com este valores a máxima produção de ácido cítrico foi de 77,3999 g/L.

Bonet *et al* (2009) transformaram glicerol em triacetina. Esta última foi obtida como a maioria dos acetais e cetais, a partir da reação do glicerol com um aldeído ou cetona sob catálise ácida.

Outras aplicações têm sido propostas para a utilização de glicerol, como a produção de hidrogênio. Sanchez, D'Angelo e Comelli (2010) estudaram a produção de hidrogênio a partir de glicerol utilizando um catalisador de níquel (5,8%p/v) suportado em alumina (Ni/Al_2O_3). Os autores avaliaram o comportamento catalítico em condições pré-determinadas (600ºC-700ºC, pressão atmosférica, proporção molar glicerol:água 16:1, alimentação 0,17L/min, WHSV 3,4-10h^{-1} e tempo de corrente de 4 a 8 horas) atingindo uma taxa de 99,7% de conversão do glicerol a hidrogênio em quatro horas a 650ºC.

Selembo *et al* (2009) verificaram que hidrogênio foi produzido a partir de resíduo glicerinoso da produção de biodiesel, a uma taxa de $0{,}41 m^3/m^3.d \pm 0{,}1 m^3/m^3.d$, através de células de eletrólise microbiana, onde os micro-organismos suportados no anodo, oxidam matéria orgânica liberando elétrons e H^+ em solução.

Com o mesmo intuito, Sabourin-Provost e Hallenbeck(2009) investigaram a alta conversão de fração de glicerol de indústria de biodiesel em hidrogênio por fotofermentação. A bactéria fotossintética *Rhodopseudomonas palustris* foi capaz realizar a conversão fotofermentativa de glicerol, puro e uma fração glicerol bruto e produzir de hidrogênio. Os autores obtiveram rendimentos relativamente elevados, até 6 mols de H_2/mol de glicerol.

Uma inovadora alternativa é utilizar o glicerol como fonte de carbono para produção de biossurfatante por micro-organismos que geralmente são exopolissacarídeos que possuem funções, dentre outras: proteger a célula bacteriana, sequestrar cátions essenciais e a aderência em superfícies sólidas, principalmente, na formação de biofilmes.

3.2 Polissacarídeos

Os polissacarídeos também chamados de gomas ou biopolímeros são substâncias hidrofílicas que se dissolvem ou se dispersam em água e como consequência aumentam a viscosidade de um sistema. Geralmente são obtidos de plantas e algas marinhas. A literatura tem descrito processos fermentativos para a produção destes compostos e grande maioria são exopolissacarídeos (EPS) que possuem propriedades físicas, estruturais e químicas semelhantes aos derivados de algas e plantas.

Os biopolímeros obtidos de plantas (goma de guar, goma arábica e pectinas), de algas (carragena, alginatos), de crustáceos (quitina) ainda dominam o mercado, sendo que os de origem microbiana (goma xantana, gelana, pululana) representam apenas uma pequena fração (CANILHA *et al*, 2006). Os micro-organismos são os agentes produtores mais adequados por apresentar taxas de crescimento mais elevadas em relação às plantas, porém o alto custo das fontes de carbono utilizadas, principalmente açúcares como a glicose, sacarose e frutose limitam o potencial de mercado desses biopolímeros.Por isso, é fundamental a busca de fontes de carbono mais baratas para esta produção (HILLIOU *et al*, 2009).

Os polissacarídeos sintetizados por bactérias dividem-se em três grupos, segundo sua localização celular: intracelulares, integrantes da parede celular e extracelulares. A pesquisa visando aplicação industrial, de modo geral, está concentrada nos polissacarídeos extracelulares, pois apresentam um processo de extração e purificação mais simples, além de possibilitarem uma produtividade mais elevada.

Os exopolisacarídeos são polissacarídeos extracelulares e as bactérias Gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa,* têm sido capazes de sintetizá-los

com eficiência. Após a purificação estes compostos podem ser facilmente caracterizados por técnicas usuais aos polímeros. A origem de alguns polissacarídeos solúveis em água estão descritos na TABELA 1 (RINAUDO, 2004).

TABELA 1 Origem de alguns polissacarídeos solúveis em água (RINAUDO, 2004)

Origem	Polissacarídeos
Plantas, algas, sementes, raízes	Pectinas, hemiceluloses, alginatos, carragena, galactomananas, glucomananas, agarose
Polissacarídeos animais (humanos, crustáceos)	Hialuronano, quitina, glicogênio, sulfato de condroitina
Polissacarídeos bacterianos	Xantana, succinoglicana, gelana, hialuronano
Polissacarídeos de fungos e leveduras	Curdulana, ecleroglucana, quitina
Derivados químicos da celulose e amido	Carboximetilcelulose, metilcelulose, amido catiônico, hidroxipropilamido.

A solubilidade em água também é uma grande vantagem dos polissacarídeos, ou biopolímeros, principalmente no que diz respeito ao elevado grau de biodegradabilidade em relação aos polímeros sintetizados quimicamente.

A biodegradação é um fenômeno natural, porém complexo. Além disso, existem fenômenos intrínsecos à biodegradação com a biodeterioração, biofragmentação e assimilação. Lucas *et al* (2008) investigaram os mecanismos e técnicas para estimar a biodegradação polimérica. Os autores relatam que há a necessidade de se estudar mais o último estágio que é a assimilação enfatizando a importância da integração dos novos materiais liberados no ambiente e a certificação de que eles entraram no ciclo biogeoquímico.

Diversas são as aplicações para estes biopolímeros desde a recuperação avançada de petróleo utilizando biossurfatantes (FANG *et al*, 2007) até a utilização como biomateriais em implantes (NAIR e LAURENCIN, 2007).

3.3 Surfatantes e Biossurfatantes

Os surfatantes são elementos importantes para muitos produtos industrializados e possuem um papel de destaque em vários processos industriais. Estes reduzem a tensão superficial ou interfacial de um líquido, a qual mede a tendência da superfície deste líquido retrair por unidade de comprimento, sendo a unidade mais utilizada mN/m (miliNewton por metro) e é representada por □.

No interior de um líquido inserido em um recipiente, as forças de atração entre as moléculas são compensadas em todas as direções. Na superfície em contato com o ar (ou com outro líquido no caso de tensão interfacial) não há essa compensação, resultando em uma força que puxa em direção ao seio do líquido. A adição de um surfatante faz com que a energia na superfície diminua por compensação, diminuindo assim, a tensão □.

Os surfatantes são moléculas anfipáticas que possuem uma porção hidrofílica (polar) e uma porção lipofílica (apolar). A porção lipofílica geralmente é uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção hidrofílica pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica. Isto faz com que eles se distribuam nas interfaces formando um filme molecular, que reduz a tensão interfacial e superficial. São capazes de aumentar a solubilidade, o poder de detergência e a capacidade espumante. As indústrias petrolíferas são as que mais utilizam os benefícios dos surfatantes, principalmente para aumentar a solubilidade dos componentes do petróleo (BOGNOLO, 1999; MULLIGAN, 2005; VAN HAMME; SINGH; WARD, 2006).

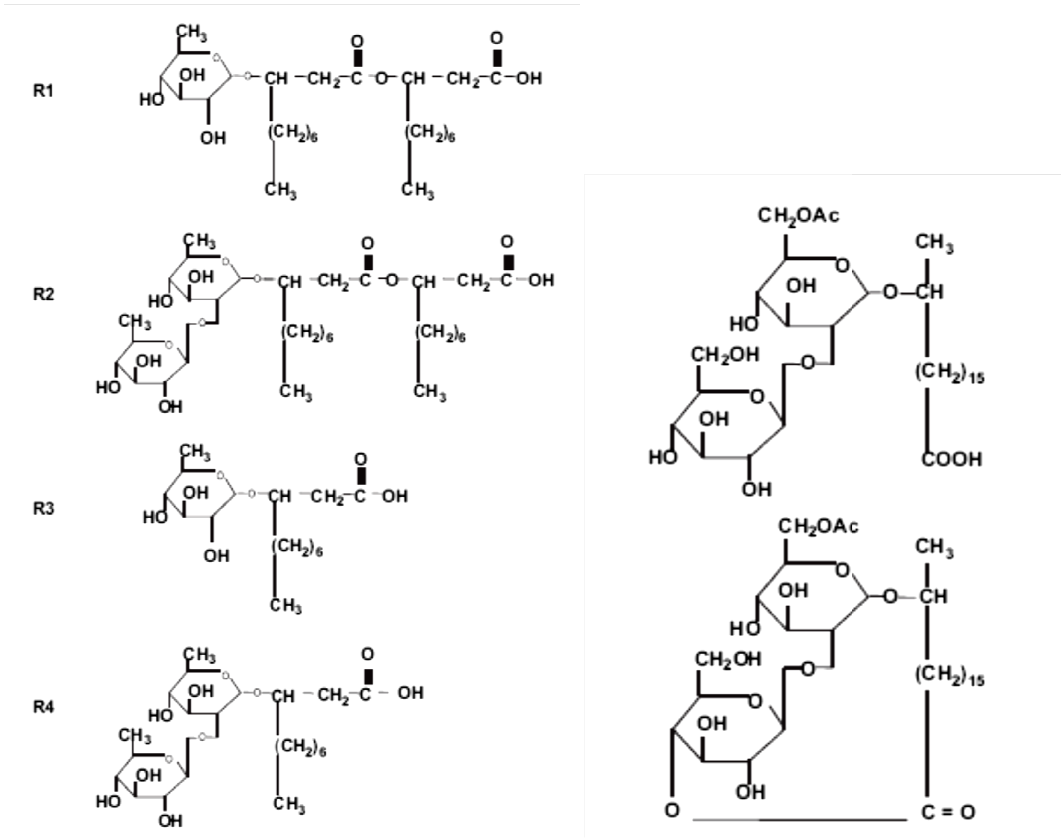
A indústria de surfatantes move cerca de US $ 9 bilhões por ano. Sabe-se que os surfatantes produzidos microbiologicamente têm uma elevada biodegradabilidade em comparação aos sintéticos e por isso despertam o interesse industrial (MAIER e SOBERÓN-CHAVES, 2000).

Os biossurfatantes são surfatantes produzidos por micro-organismos e uma variedade deles pode produzi-los. Alguns são produzidos a partir de substratos como açúcares, óleos e alcanos sendo formados como subprodutos metabólicos (COLLA e COSTA, 2003). Algumas estruturas típicas de biossurfatantes estão representadas na Figura 4.

Barbosa e Paz (2007) utilizaram óleo de pequi como substrato para produzir biossurfatante pela bactéria *Chromobacterium violaceum*. Os resultados obtidos indicaram um índice emulsificação de n-hexadecano máximo de 43,3% com 60 horas de cultivo.

Costa, Nitschke e Contiero (2006) produziram biotensoativos a partir de resíduos oleosos. Foram isolados dezoito tipos de micro-organismos provenientes de solos de abatedouros, aterros industriais e postos de gasolina. As espécies *Pseudomonas* sp. de linhagem LMI 6c e LMI 7a sintetizaram ramnolipídeos a partir de resíduos de óleos e gorduras, sendo a borra de soja e o óleo de soja as melhores fontes para produção de biossurfatante, no caso.

Nawawi, Jamal e Alan (2010) utilizaram borra de óleo de palma para a produção de biossurfatante. Esta borra foi coletada de uma fábrica de óleo de palma na Malásia e, à temperatura ambiente, possui o aspecto alaranjado e é semi-sólida. Foram isoladas vinte e dois tipos de micro-organismos, sendo empregadas apenas bactérias. Os resultados indicaram que dentre os nutrientes usados para preparação do meio de cultivo, glicose, sacarose, $NaNO_3$, $FeSO_4$, $MgSO_4$ e K_2HPO_4 foram essenciais na produção e a cepa S02 mostrou a menor tensão superficial, 36,2 mN/m.



(a) (b)

Figura 4 Estruturas típicas de biossurfatantes. (a) Quatro estruturas diferentes de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* (b) Soforose lipídeo por *C. bombicola* (MULLIGAN, 2005).

Muitos dos biossurfatantes são do tipo não-iônicos (neutros), aniônicos e poucos catiônicos, onde a presença de grupos contendo nitrogênio concede certo caráter catiônico à parte da molécula, como exemplo, a adsorção em sólidos dispersos e na floculação. A porção lipofílica da molécula está baseada em longas cadeias de ácidos graxos. A porção hidrofílica pode ser um aminoácido, peptídeo, hidróxido, fosfato, grupo carboxílico ou carboidrato (FONSECA *et al*, 2007; BOGNOLO, 1999; DESAI e BANAT, 1997; HEALY; DEVINE; MURPHY, 1996).

Enquanto os surfatantes sintéticos são classificados segundo a natureza do grupamento polar, os biossurfatantes são classificados principalmente por suas composições químicas e origem microbiana (DESAI e BANAT, 1997).

Existem inúmeras aplicações para os biosurfatantes (NITSKE e PASTORE, 2002) como a biorremediação de áreas contaminadas (THAVASI; JAYALAKSHMI; BANAT, 2011) e na recuperação avançada de petróleo (BANAT, 1995), aumentando a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo e diminuindo a viscosidade do óleo, respectivamente (JOSEPH e JOSEPH, 2009; CALVO *et al*, 2009; CAMEOTRA e SINGH, 2008; WHANG *et al*, 2008); na remoção de metais pesados (DAS; MUKHERJEE; SEN, 2009); em aplicações terapêuticas (RODRIGUES *et al*, 2006; ZHAO *et al*, 1999); em alimentos como emulsionantes de matérias primas (NITSKE e COSTA, 2007); em produtos de higiene; na indústria têxtil, farmacêutica e cosmética (GHARAEI-FATHABAD, 2011; DESAI e BANAT, 1997; HEALY; DEVINE; MURPHY, 1996).

Lai *et al* (2009) utilizaram biossurfatante para remoção de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) de um solo contaminado com óleo. Os autores compararam a eficiência dos biossurfatantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtillis* com os surfatantes sintéticos Tween 80 e Triton X-100. Obteve-se a maior eficiência de remoção quando utilizados os ramnolipídeos, com 63% para o solo contaminado com 9000mg TPH/solo seco, o que não aconteceu quando empregados surfatantes sintéticos. Foram produzidos também, biossurfatantes a partir de *Serratia marcescens* e *Agrobacterium* sp QS-6, porém estes não apresentaram resultados significativos na remoção de TPH.

Das, Mukherjee e Sem (2009) investigaram a ação anti-adesiva de um biossurfatante. O biossurfatante foi produzido pelo micro-organismo *Bacillus circulans*, isolado de ambiente marinho, em meio contendo glicerol. A atividade anti-adesiva do biossurfatante foi testada em discos de poliestireno incubados a 37°C por um período de 12 horas em caldo nutriente com as seguintes cepas bacterianas: *Escherichia coli* (NCIM 2931), *Micrococcus flavus* (NCIM 2376), *Proteus vulgaris* (NCIM 2857), *Serratia marcescens* (NCIM 2397), *Citrobacter freundii* (NCIM 2488), *Klebsiella aerogenes* (NCIM 2098), *Alcaligens faecalis* (NCIM 2105) e *Salmonella typhimurium* (NCIM 2501). As porcentagens de inibição da adesão variaram de 15% a 89% usando 0,1-10 g/L do biossurfatante puro sendo apresentando um ótimo potencial em aplicações biomédicas, instrumentos cirúrgicos e implantes.

Muitos micro-organismos que produzem biossurfatantes são aeróbios e poucos são anaeróbios. A maior parte dos biossurfatantes é produzida pelo crescimento aeróbio de micro-organismos em meio aquoso contendo uma fonte de carbono (carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras ou misturas disto) e são secretados dentro do meio de cultura durante o processo de crescimento auxiliando no transporte de compostos insolúveis através das membranas celulares (GRISHCHENKOV *et al*, 2000).

A literatura apresenta diversos micro-organismos produtores de biossurfatante, dentre eles pode-se citar alguns não tão comuns como *Candida ishiwadae* (THANONSUB *et al*, 2004), *Pseudozyma siamensis* (MORITA *et al*, 2008), *Alcanivorax* sp. (OLIVERA *et al*, 2009) e *Rhodococcus* sp (SHAVANDI *et al*, 2011). Os tipos e a origem microbiana dos biossurfatantes estão descritas na TABELA 2.

TABELA 2 Tipo e origem microbiana de biossurfatantes (adaptado de MULLIGAN, 2005).

Tipo	Micro-organismo
Trealose lipídeos	*Arthrobacter paraffineus, Corynebacterium spp., Mycobacterium spp., Rhodococus erythropolis, Nocardia sp*
Ramnolipídeos	*Pseudomonas aeruginosa, Pseudomomas sp., Serratia rubidea*
Soforose lipídeos	*Candida apicola, Candida bombicola,*
	Candida lipolytica, Candida bogoriensis
Glicolipídeos	*Alcanivorax borkumensis, Arthrobacter sp., Corynebacterium sp.,R. erythropolis,*
	Serratia marcesceus, Tsukamurella sp.
Celobiose lipídeos	*Ustilago maydis*

TABELA 2 Tipo e origem microbiana de biosurfatantes (adaptado de MULLIGAN, 2005) - continuação.

Tipo	Micro-organismo
Fosfolipídeos	*Acinetobacter sp.*
Poliol lipídeos	*Rhodotorula glutinus, Rhodotorula graminus*
Diglicosil diglicerídeos	*Lactobacillus fermentii*
Lichesina A, Lichesina B	*Bacillus licheniformis*
Lipopolissacarídeos	*Acinetobacter calcoaceticus (RAG1)*
	Pseudomonas sp., Candida lipolytica
Alasan	*Acinetobacter radioresistens*
Streptofactina	*Streptomyces tendae*
Surfatante particulado	*Pseudomonas marginalis*
Biosur PM	*Pseudomonas maltophia*
Emulsan	*Acinetobacter calcoaceticus*
Liposan	*Candida lipolytica*
Manana-lipídeo-proteína	*Candida tropicalis*
Carboidrato-lipídeo-proteína	*Pseudomonas fluorescens*

A composição e rendimentos dos biossurfatantes dependem do micro-organismo, pH, composição do meio, substrato e temperatura usada para o crescimento. Os biossurfatantes são biodegradáveis e podem ser produzidos em

grandes quantidades pelos micro-organismos, podendo substituir os tradicionais surfatantes sintéticos (MULLIGAN, 2005).

As propriedades físico-químicas e a composição química de trealose lipídeos produzidos por *Rhodococcus erythropolis* 51T7 foram estudadas por Marqués *et al* (2009). Os autores verificaram que o biossurfatante é um tetraester trealose (THL) onde a concentração micelar crítica (CMC) foi de 0,037 g/L e a tensão interfacial contra hexadecano foi 5mN/m.

Morita *et al* (2007) estudaram a conversão microbiológica de glicerol em biossurfatantes glicolipídicos pela levedura *Pseudozyma antartica* JCM 10317. Este micro-organismo produziu eficientemente manosileritritol lipídeo (MEL), 16, 3 g/L, em uma batelada alimentada de glicerol.

Na produção de biossurfatantes também deve ser levado em consideração a caracterização dos produtos formados e os processos de extração e purificação que muitas vezes são dispendiosos e, em geral, aumentam o custo total do produto. Antes dos processos envolvendo caracterização e purificação, é necessário que a pesquisa tenha um conhecimento antecipado dos parâmetros que irão ser estudados, assim como a otimização e tendências estatísticas. Além disto faz-se necessário a minimização dos custos e tempos (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Monteiro *et al* (2007) fizeram a caracterização estrutural e molecular de um biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* quando cultivadas em um meio contendo glicerol e nitrato de amônio. O micro-organismo produziu uma mistura de doze ramnolipídeos, os quais reduziram tensão superficial até 27 mN/m. Wey; Choub; Chan (2005) comprovaram que este micro-organismo foi capaz assimilar sete fontes de carbono diferentes e produzir ramnolipídeo, são elas: glicose, glicerol, óleo de oliva, óleo de girassol, óleo de semente de uva, diesel e querosene.

Haba *et al* (2007) estudaram os efeitos da temperatura e dos nutrientes na produção de poli 3(hidroxi-alcanoatos) por *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCBIM 40044), em substratos oleosos. Os autores verificaram que os polímeros variaram na natureza e número dos monômeros e a mais alta produtividade de 8,2g PHA/(g biomassa residual.h) ocorreu a 37°C. Os micro-organismos também foram capazes

de produzir até 10g/L de ramnolipídeos quando cultivados em meio contendo óleo de cozinha residual.

Segundo Costa *et al* (2006), uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* LBI, produziu ramnolipídeos utilizando como substrato óleos naturais do ambiente brasileiro como óleo de cupuaçu, andiroba, dentre outros.

3.4 O Importante Papel de *Pseudomonas aeruginosa* na Produção de Biossurfatantes

Espécies microbianas são capazes de produzir polissacarídeos com características surfatantes, especialmente os micro-organismos procariotas. As bactérias Gram-negativas, como *Pseudomonas* sp, também têm sido apontadas como as de melhor aptidão para o processo. Um grande número de polissacarídeos bacterianos já foi produzido, mas poucos comercialmente (SUTHERLAND, 2001). Eles podem formar uma grande série de polímeros com estruturas moleculares distintas e aplicações em diferentes domínios, tais como cosméticos, alimentos, tintas e clarificação da água (RINAUDO, 2004).

Pseudomonas sp produzem ramnolipídeos, que são glicolipídeos com características surfatantes e podem diminuir a tensão superficial da água de 72mN/m para 30 mN/m. Estas bactérias apresentam o incoveniente de serem patógenas oportunistas (VASCONCELLOS, 2005). Normalmente encontram-se bastante difundidas no ambiente incluindo água, solo e plantas (WU *et al*, 2008). Diversas aplicações têm sido citadas na literatura para estes micro-organismos que podendo agir consorciados como na biodegradação de hidrocarbonetos e óleo diesel (KACZORECK e OLSZANOWSKI, 2011) ou na produção de ramnolipídeos (ABDEL-MAWGOUD *et al*, 2011; DARVISHI *et al*, 2011).

Muitas são as fontes de carbono que podem ser utilizadas para a produção de ramnolipídeos pelo gênero *Pseudomonas* sp como óleo de palma (OLIVEIRA *et al*, 2009; PORNSUNTHORNTAWEE *et al*, 2009), óleo de soja (PRIETO *et al*, 2008; CHA *et al*, 2008), óleo de oliva (ABOUSEUOUD *et al*, 2009) hidrocarbonetos de petróleo (VERMA; BHARGAVA; PRUTHIB, 2006), resíduos de diferentes composições (HILLIOU *et al*, 2009; QIUZHUO; WEIMIN; JUAN, 2008) e meios

enriquecidos (LOTFABAD *et al*, 2009; DAGBERT; MEYLHEU; BELLON-FONTAINE, 2008; HUNG; SANTSCHI; GILLOW, 2005).

Freitas *et al* (2009a) verificaram o comportamento emulsificante e as propriedades reológicas de um exopolissacarídeo (EPS) produzido por *Pseudomonas oleovorans* cultivada em glicerol gerado pela indústria do biodiesel. Os autores obtiveram um heteropolissacarídeo extracelular de alta massa molar ($4{,}6X10^6$g), composto por açúcares (galactose, 68%; manose, 17%; glicose 13%; ramnose, 2%; fucose, 4%) e de grupamentos acila (3,04%) com comportamento de fluido pseudoplástico em meio aquoso. O EPS foi capaz de estabilizar emulsões de água com vários compostos hidrofóbicos, incluindo os hidrocarbonetos e óleos vegetais e minerais.

Freitas *et al* (2009b) caracterizaram um polissacarídeo produzido por *Pseudomonas* sp. utilizando glicerol como fonte de carbono. Os autores observaram que o exopolissacarídeo era composto principalmente por galactose, com pequenas quantidades de manose, glicose e ramnose. A sua estrutura amorfa conferiu uma temperatura de transição vítrea de -155,7^{o}C. A solução aquosa possuía propriedades viscoelásticas similares à goma guar, além de um caráter polieletrolítico. Adicionalmente, o exopolissacarídeo demonstrou boa floculação, propriedades emulsificantes e capacidade para formação filmes.

Camilios Neto *et al* (2008) otimizou a produção de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 suportadas em bagaço de cana. Os autores observaram que a produção em cultura líquida é dificultada pela formação de espuma, por isso utilizaram bagaço de cana impregnado com uma solução contendo glicerol. Conseguiram aumentar a produção do biossurfatante cerca de 10 vezes em comparação a culturas em meio líquido, atingindo 172 g de ramnolipídeo/kg de substrato, após 12 dias de processo. O rendimento foi de 46g de ramnolipídeo/L de solução e o índice de emulsificação em querosene atingiu valores superiores a 90%.

Santa Anna *et al* (2002) utilizaram diferentes fontes de carbono (n-hexadecano, óleo parafínico, glicerol e óleo de babaçu) e de diferentes fontes de nitrogênio ($NaNO_3$, $(NH_4)_2SO_4$, CH_4N_2O) para a produção de biossurfatantes com

Pseudomonas aeruginosa PA1 isolada de resíduo oleoso de uma planta de processamento do nordeste do Brasil. O glicerol foi considerado a melhor fonte de carbono de acordo com os testes realizados, em uma razão C/N=60/1 e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. Foram realizados testes de toxicidade com o meio, utilizando dois micro-organismos, *Daphnia similis e Vibrio fisheri*, obtendo um valor de 13,0 mg/L e 13,8 mg/L, respectivamente.

Pornsunthorntawee *et al* (2009) verificaram a produção de biossurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* SP4, utilizando cultivos em batelada em sequencial (SBRs) e analisaram os efeitos da adição de óleo e o tempo de ciclo. O micro-organismo foi isolado de um solo contaminado com óleo na Tailândia, sendo a temperatura de operação de 37°C, usando meio mineral acrescido de óleo de palma. Os resultados demonstraram que dois dias de ciclo foram suficientes para se obter uma diminuição da tensão superficial de 59% e uma remoção de óleo de 97%.

A melhoria na produção de di-ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* J16 foi estudada por Wei *et al* (2008). Análises de RMN e espectrometria de massas mostraram que o biossurfatante consistia principalmente de monorramnolipídeos (RL2) e dirramnolipídeos (RL1) dependendo das fontes de nitrogênio e carbono utilizadas. Três parâmetros foram avaliados (concentrações de glicerol, $(NH_4)_2SO_4$ e $MgSO_4.7H_2O$) em um experimento fatorial de dois níveis, sendo a metodologia da superfície de resposta utilizada para avaliar as melhores concentrações destes três parâmetros. A melhor concentração de glicerol foi de 0,38 mol/L, 33,3 mmol/L para $(NH_4)_2SO_4$ e de 577μmol/L para $MgSO_4.7H_2O$.

Rooney *et al* (2009) isolaram e caracterizaram bactérias produtoras de ramnolipídeos de uma unidade de biodiesel. As bactérias foram isoladas de solos de uma instalação de biodiesel utilizando glicerol como única fonte de carbono. Os micro-organismos identificados foram: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *Pantoea stewartii* e *Pseudomonas aeruginosa*. As espécies foram capazes de produzir, principalmente, mono e di-ramnolipídeos.

O glicerol foi uma das fontes de carbono estudadas por Costa *et al* (2009) para a produção de ramnolipídeos e poli-hidroxialcanoatos por várias cepas de P*seudomonas aeruginosa*. A caracterização dos polímeros e dos surfatantes

produzidos foram feitas por HPLC e cromatrografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. As cepas foram capazes de produzir cerca de 220 mg/L a partir de um meio contendo 2% m/v de glicerol.

3.5 Aplicações Industriais para os Biossurfatantes: Recuperação Avançada de Petróleo e a Era Pré-Sal

O petróleo resultante da decomposição de matéria orgânica é composto basicamente de hidrocarbonetos fazendo parte de diversos produtos utilizados no dia-a-dia do homem. Ele fica acumulado em rochas reservatório, as quais apresentam vazios, poros e fissuras interligados onde podem circular os hidrocarbonetos e a água.

A recuperação do petróleo é feita através de perfurações na rocha sendo necessário que a pressão do poço produtor seja menor que a do reservatório para que aconteça a migração do óleo para o poço. A remoção pode ser feita de diversas formas como por injeção de água, gás ou fluidos. Estes métodos, porém, retiram uma pequena parte do óleo armazenado na rocha, muitas vezes apenas 15% do total. Devido a isto a pesquisa tem se intensificado quanto à otimização dos métodos de exploração e recuperação de petróleo. A recuperação avançada engloba todos os métodos que tenham como objetivo principal acelerar e aumentar a produção total de um poço de petróleo (CURBELO, 2006).

Neste cenário a pesquisa biotecnológica tem desempenhado um papel significativo. A recuperação microbiológica melhorada de petróleo (MEOR) é a estimulação de micro-organismos para a produção de metabólitos que visam aumentar a produção de óleo no poço de petróleo, sendo os biossurfatantes uma das mais promissoras e avançadas técnicas de remoção do óleo (SEN, 2008).

A utilização de biossurfatantes para este fim tem sido relatada na literatura há alguns anos (BRYANT e BURCHFLELD, 1989; BANAT, 1995). Estudos recentes têm utilizado micro-organismos autóctones com a finalidade de aumentar a biomassa celular e os biossurfatantes para entrar em zonas de baixa permeabilidade da rocha reservatório (RECKSIDLER *et al*, 2010; SAMIR *et al*, 2010; BAO *et al*, 2009).

Além dos biossurfatantes produzidos por diferentes micro-organismos como *Bacillus licheniformis* (AL-SULAIMANI *et al*, 2010), *Bacillus subtillis* (WANG *et al*, 2009), *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (FANG *et al*, 2007) outros métodos são aplicados como a injeção de CO_2 (EFTEKHART *et al*, 2011).

A preocupação com a melhoria na produção do óleo cresceu principalmente com a descoberta de novas reservas. No Brasil os dados atuais indicam a ocorrência de reservatórios do tipo carbonato abaixo de uma camada de sal que se estende do litoral do Espírito Santo até o litoral de Santa Catarina. Estima-se que a camada pré-sal tenha uma área de 112 mil km^2. Desse total, 41mil km^2 já foram licitados e concedidos. Essa camada tem aproximadamente 800 km de comprimento e, em algumas áreas, 200 km de largura (LIMA, 2011). A Figura 5 ilustra estas informações.

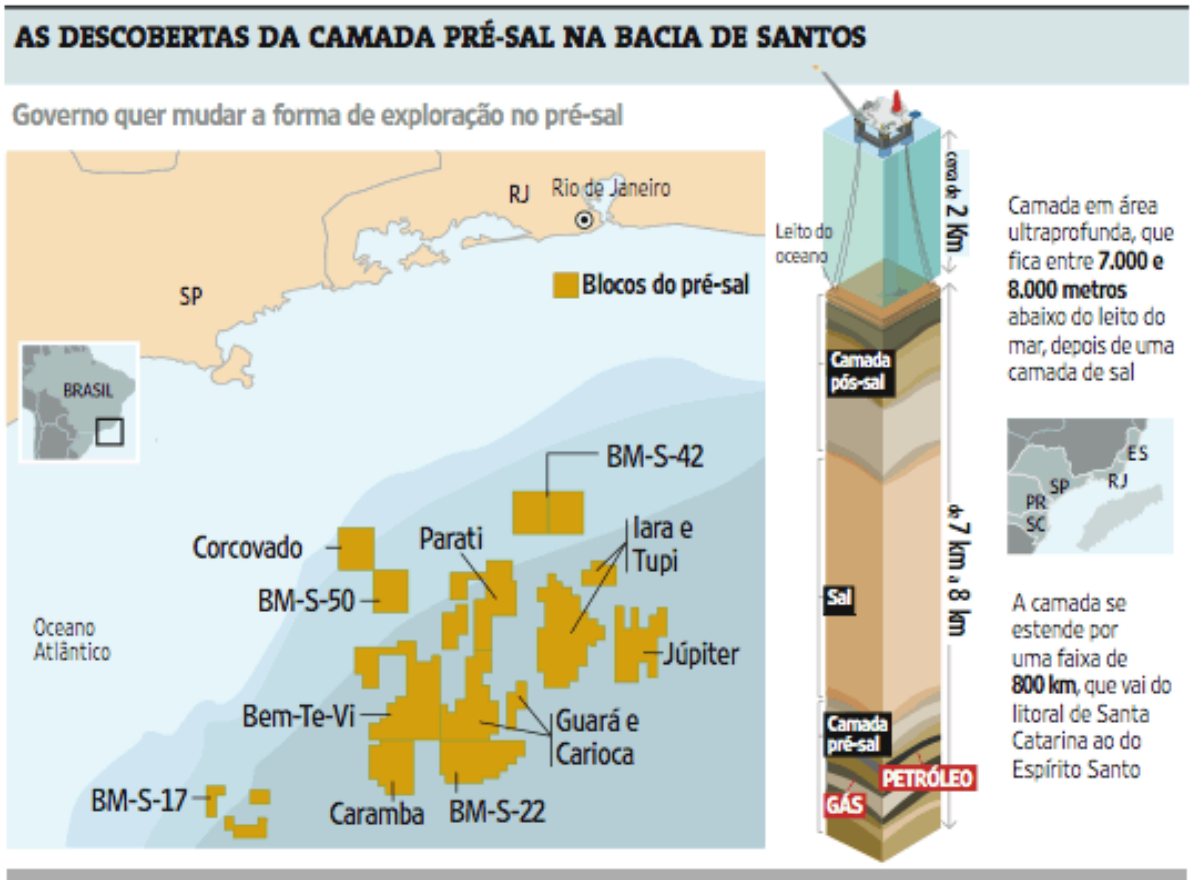


Figura 5 As descobertas da camada pré-sal na Bacia de Santos (LIMA, 2011).

Com isto buscam-se tecnologias eficazes que tornem possível a extração do maior volume deste óleo. Os biossurfatantes são uma ótima alternativa para este

fim, principalmente quando a fonte de carbono utilizada para a produção é um resíduo, como o glicerol. Para isto também é necessário inserir na pesquisa científica a caracterização do biossurfatante formado para que ele tenha uma melhor aplicabilidade, assim como um tratamento estatístico eficiente.

3.6 Vantagens do Tratamento Estatístico e da Caracterização

Para um experimento ou pesquisa tornar-se eficiente, é necessário conhecer quais as variáveis importantes do processo e analisar as tendências estatísticas da resposta que se deseja obter, sendo o planejamento de experimentos uma ferramenta eficaz para este intuito (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

Muitas vezes é necessário mais de um delineamento experimental para que a pesquisa alcance seu intuito principal. O planejamento por ser uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, melhora a qualidade das informações obtidas nos resultados, minimizando custos e tempos, maximizando rendimentos e aumentando a produtividade (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

O tipo mais simples de planejamento é o fatorial do tipo 2^k, onde k é o número total de variáveis independentes investigadas cada uma em dois níveis. Em um planejamento fatorial cada tentativa completa ou réplica do experimento, todas as combinações possíveis dos níveis dos fatores devem ser investigadas (MONTGOMERY e RUNGER, 2003).

Joshi; Yadav; Desai (2008) aplicaram a metodologia da superfície de resposta com planejamento fatorial completo 2^4, para averiguar os componentes ótimos para melhorar a produção de liquesina por *Bacillus liqueniformis* R2. O planejamento fez com que a produção do biossurfatante fosse aumentada, alcançando tensões superficiais de 29 mN/m.

A tensão superficial não é, isoladamente, uma ferramenta para determinar todas as propriedades de um biossurfatante, principalmente porque estes compostos têm estruturas químicas diversas que incluem glicolipídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos, lipídeos neutros, lipopeptídios e estruturas complexas como lipoproteínas (ABDEL-MAWGOUD, ABOULWAFA, HASSOUNA, 2009). Devido a isto, são necessárias técnicas mais apuradas como a análise termogravimétrica (TG), a

espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourrier (FTIR), viscosimetria e análise dos açúcares que compõe a molécula.

CAPÍTULO 4

Metodologia

4.1 Micro-organismo para Produção de Biossurfatante

Utilizou-se a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* EQ109 oriunda de ambiente contaminado com óleo cru, cedida pelo banco de cepas do Laboratório de Microbiologia do Petróleo da Escola de Química da UFRJ e mantida em Ágar nutriente glicosado (composição em g/L: glicose 5; peptona 10; extrato de carne 3; Ágar-Ágar 15) a 4$\pm$1°C e pH 7,0.

4.2 Meio de cultura

Para a condução dos experimentos utilizou-se o meio de cultura com a seguinte composição (g/L): $(NH_4)_2HPO_4$ 3,3; K_2HPO_4, 5,8; KH_2PO_4, 3,7; 50 de glicerol (VETEC); 10mL de solução 100mmol/L de $MgSO_4$ e 1mL de solução de micronutrientes (em g/L: $FeSO_4.7H_2O$, 2,78; $MnCl_2.4H_2O$, 1,98; $CoSO_4.7H_2O$, 2,81; $CaCl_2.2H_2O$, 1,67; $CuCl_2.2H_2O$, 0,17; $ZnSO_4.7H_2O$, 0,29 e HCl 1,0 mol/L) em pH 7,0 (FREITAS *et al*, 2008). O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C$\pm$1°C, 1atm por 20 minutos.

4.3 Experimentos

4.3.1 Análise da Influência do pH, da Concentração Inicial de Biomassa e da Concentração Inicial de Glicerol Utilizando um Planejamento Experimental 2^3 para a Produção de Biossurfatante por Pseudomonas aeruginosa EQ 109.

a) Preparo do Inóculo

Os inóculos foram preparados em frascos Erlenmeyer com capacidade de 500 mL contendo 100 mL de meio e diferentes concentrações de glicerol: 30,0; 40,0 e 50,0 g/L. Após inoculação os frascos foram incubados em mesa agitadora modelo Tecnal® TE-420 a 170 rpm e 30 ºC $\pm$1ºC/24h (VIEIRA *et al*,2005).

b) Desenho Experimental

Realizou-se um planejamento experimental 2^3 em duplicata, utilizando-se três variáveis: pH (A), concentração de inóculo (B) e concentração inicial de glicerol (C) e cada variável com dois níveis, superior (+1) e inferior (-1), e quatro pontos centrais

(0), a fim de otimizar os parâmetros para o início do processo em fermentador conforme TABELA 3, acompanhado dos ensaios controle.

Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer com capacidade de 500 mL contendo 100 mL de meio incubados em mesa agitadora modelo Tecnal® TE-420 a 150 rpm, sob temperatura de 30ºC±1ºC, por um período de três dias. Foram realizadas amostragens nos tempos 24 horas, 48 horas e 72 horas. O pH foi controlado em 7,0 diariamente com soluções de NaOH 30%m/v e HCl 0,45 mol/L.

Como resposta foi adotada a concentração de biomassa final (XF g/L), o índice de emulsificação (IE%), a diminuição da tensão superficial (DT %), o consumo de glicerol (CG %) nos intervalos de tempo de fermentação de 24 horas, 48 horas e 72 horas. Os resultados obtidos para o tempo de 72 horas foram avaliados estatisticamente pelo software *Design Expert 7.1.5., da Stat- Ease Inc.®*

TABELA 3 Experimentos Realizados Segundo Planejamento Fatorial 2^3

Experimentos	A: pH	B: Biomassa Inicial x 10^{-5} (g/(L de meio))	C: Concentração Inicial de Glicerol (g/L)
1	5,0 (-1)	3,1 (-1)	30 (-1)
2	5,0 (-1)	3,1 (-1)	30 (-1)
3	7,0 (+1)	3,1 (-1)	30 (-1)
4	7,0 (+1)	3,1 (-1)	30 (-1)
5	5,0 (-1)	6,2 (+1)	30 (-1)
6	5,0 (-1)	6,2 (+1)	30 (-1)
7	7,0 (+1)	6,2 (+1)	30 (-1)
8	7,0 (+1)	6,2 (+1)	30 (-1)
9	5,0 (-1)	3,1 (-1)	50 (+1)
10	5,0 (-1)	3,1 (-1)	50 (+1)
11	7,0 (+1)	3,1 (-1)	50 (+1)
12	7,0 (+1)	3,1 (-1)	50 (+1)
13	5,0 (-1)	6,2 (+1)	50 (+1)

TABELA 3 Experimentos Realizados Segundo Planejamento Fatorial 2^3 (continuação)

Experimentos	A: pH	B: Biomassa Inicial x 10^{-5} (g/(L de meio))	C: Concentração Inicial de Glicerol (g/L)
14	5,0 (-1)	6,2 (+1)	50 (+1)
15	7,0 (+1)	6,2 (+1)	50 (+1)
16	7,0 (+1)	6,2 (+1)	50 (+1)
17	6,0 (0)	4,7 (0)	40 (0)
18	6,0 (0)	4,7 (0)	40 (0)
19	6,0 (0)	4,7 (0)	40 (0)
20	6,0 (0)	4,7 (0)	40 (0)
21	5,0 (-1)	Controle	30 (-1)
22	5,0 (-1)	Controle	50 (+1)
23	7,0 (+1)	Controle	30 (-1)
24	7,0 (+1)	Controle	50 (+1)
25	6,0 (0)	Controle	40 (0)

4.4 Produção de Biossurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 em Fermentador: Fase I

Os experimentos foram conduzidos em fermentador com capacidade para 2L, modelo Multigen marca New Brunswick Scientific (Figura 6), contendo 1L de meio e 50g/L de glicerol, inoculado com 10% de inoculo de 24 horas, agitação de 300 RPM sob temperatura de 30ºC$\pm$1ºC. Foram realizadas amostragens nos tempos de 0, 24 horas, 48 horas e 72 horas tendo como respostas as medidas de índice de emulsificação (IE %), diminuição da tensão superficial (DT%), consumo de glicerol (CG %) e biomassa final (Xf). O pH foi controlado manualmente em 7,0 com soluções de NaOH 30% m/v e H_2SO4 0,2 mol/L.

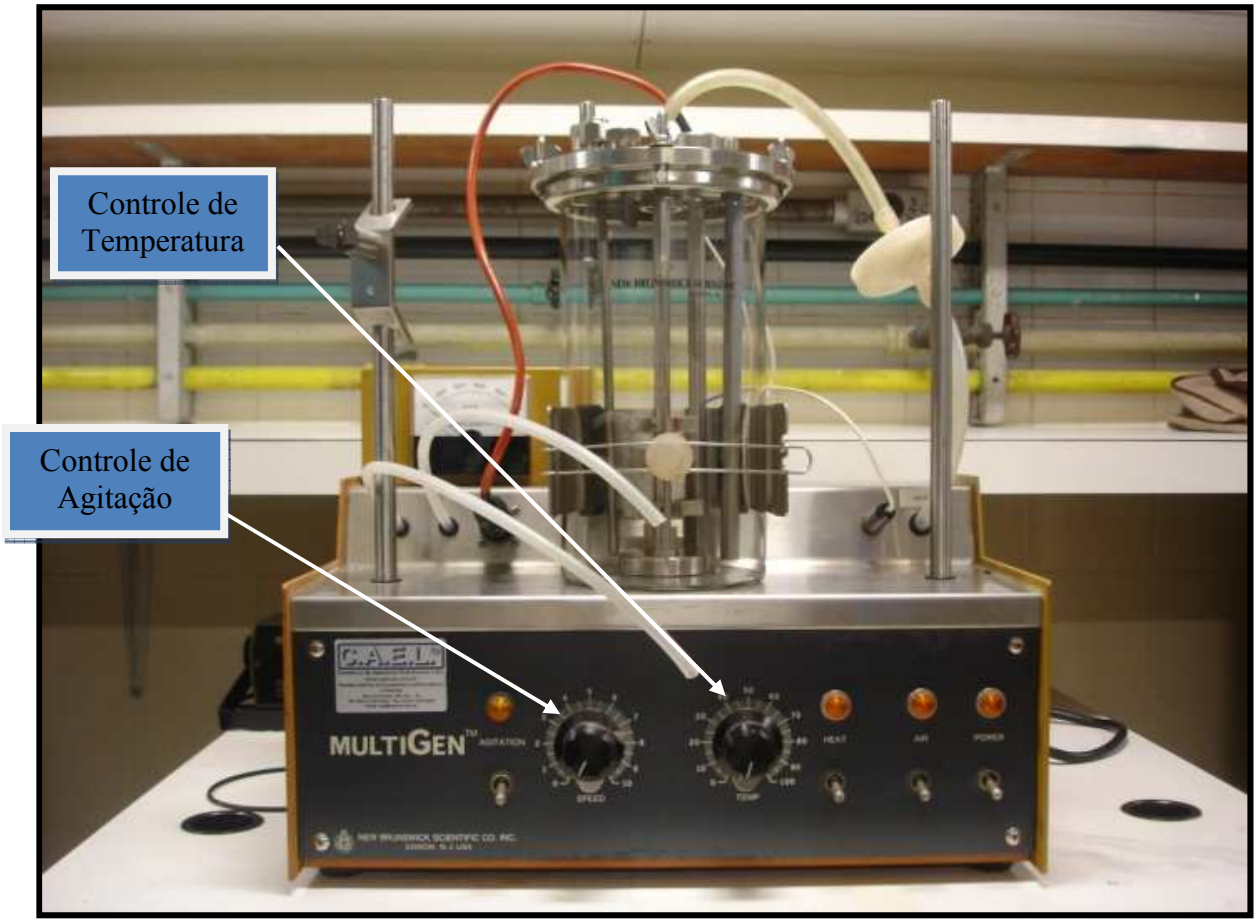


Figura 6 – Fermentador utilizado no experimento, capacidade total de 2L, modelo Multigen marca New Brunswick Scientific Co. (New Jersey, EUA)

4.5 Produção de Biossurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 em Fermentador: Fase II

Os experimentos foram conduzidos em fermentador com capacidade para 3L, modelo Bio Flo/Celligen 115 marca New Brunswick Scientific (Figura 7), contendo 1L de meio e 50g/L de glicerol, inoculado com 10% de inóculo de 24 horas, agitação de 300 RPM sob temperatura de 30±1ºC. Foram realizadas amostragens nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas tendo como respostas as medidas de índice de emulsificação (IE %), consumo de glicerol (CG %), biomassa final (Xf) e diminuição da tensão superficial (%DT). O pH foi controlado automaticamente em 7,0 com soluções de NaOH 30% m/v e H_2SO4 0,2 mol/L.

Figura 7 Fermentador utilizado no experimento, capacidade de 3L, modelo Bio Flo/Celligen 115, New Brunswick Scientific (New Jersey, EUA).

4.6 Recuperação e Purificação do Biossurfatante

O caldo fermentado livre de células por meio da centrifugação a 7000xg por 20 minutos foi tratado com etanol a 95% v/v na proporção 1:3. A mistura foi mantida sob agitação por 4 horas. Após isto, o Experimento foi conservado em geladeira a $\pm 4^{o}C$ por 12 horas. O precipitado formado (biossurfatante) foi retirado após centrifugação a 6000xg por 20 minutos, armazenado em placa de Petri e estocado em dessecador até estar completamente seco.

Para a purificação, foi preparada uma solução 2,0 g/L do biossurfatante em estoque. Esta solução foi mantida sob agitação em placa agitadora por 12 horas a temperatura ambiente. Após completa solubilização foi feita uma nova precipitação com álcool 95%v/v sob agitação intensa e a solução resultante foi mantida em geladeira a $\pm$ $4^{o}C$ por 12 horas. Após este período o precipitado formado

(biossurfatante) foi retirado por centrifugação a 7000xg por 20 minutos, armazenado em placa de Petri e mantido em dessecador até estar completamente seco. A Figura 8 ilustra de maneira simplificada o método utilizado.

4.7 Determinações Analíticas

As determinações analíticas foram realizadas em cultivo livre de células obtido pela centrifugação do meio fermentado durante 30 minutos a 4100 g em centrífuga Fabbe-Primar®, modelo 103.

4.7.1 Índice de emulsificação ou atividade emulsificante

O líquido fermentado livre de células foi utilizado para determinar o índice de emulsificação pelo método adaptado e descrito por Cooper e Goldenberg (1987). Para determinação do índice foi utilizado o mosto fermentado adicionado de querosene de aviação na proporção 1:1 pela homogeneização em vórtex por 2 minutos, a 25ºC$\pm$1°C. A leitura foi realizada através de medição da altura da emulsão formada após 24 horas de repouso. O índice foi calculado através da equação: Índice de emulsificação (%) = H_e X 100 / H_t, onde H_e = altura da emulsão; H_t = altura total do líquido.

4.7.2 Tensão superficial

A tensão superficial foi medida em tensiômetro da modelo K11 marca KRUSS, utilizando um anel de platina-iridium. As análises foram realizadas 25ºC$\pm$1ºC e o aparelho foi previamente calibrado conforme o método descrito por Du Nouy (COOPER e ZAJIC, 1979).

4.7.3 Determinação da Biomassa

A biomassa foi quantificada relacionando-se a absorvância em comprimento de onda de 480 nm em espectrofotômetro modelo Oddyssey (Hach®), com peso seco obtido a 80°C até valor constante em estufa modelo 119 marca Fabbe®. Para ambas as determinações as células foram previamente lavadas três vezes com água destilada.

4.7.4 pH

O pH foi medido utilizando potenciômetro digital DM-20 precisão = ±0,01 e calibrado com soluções de tampão fosfato pH 4,0 e 7,0 a 25ºC±1ºC.

4.7.5 Dosagem de Glicerol

O método utilizado para a determinação de glicerol foi um método adaptado ao descrito por Coks e Van Rede (1966) *apud* Leal (2004). O método baseia-se na reação da amostra que contém glicerol com periodato de sódio ($NaIO_4$) em solução aquosa ácida para produzir formaldeído e ácido fórmico, sendo este último usado para determinação de glicerol, através da titulação com NaOH 0,125N. A percentagem de glicerol contida na amostra foi determinada segundo a Equação 1 abaixo:

$$G = \frac{9,209\ M(V1 - V2)}{Vam} \quad (1)$$

G= teor de glicerol (%m/v)

M= concentração de NaOH em mol/L

$\mathbf{V_1}$= volume da solução de NaOH gasto na titulação da amostra (mL)

$\mathbf{V_2}$= volume da solução de NaOH gasto na titulação do branco (mL)

$\mathbf{V_{am}}$= volume de amostra

4.8 Caracterização do Biossurfatante Produzido por Análises Qualitativas e Quantitativas

4.8.1 Determinação da Concentração Micelar Crítica

A concentração micelar crítica do biossurfatante foi determinada por tensiometria do anel em tensiômetro da modelo K11 (KRUSS). O método baseou-se no preparo de soluções com diferentes concentrações do biossurfatante impuro e posterior leitura em tensiômetro, utilizando um anel de platina-iridium. As análises

foram realizadas a 25ºC±1ºC (OZDEMIR; PEKER; HELVACI, 2004; MANIASSO, 2001).

Com os valores de tensão superficial, foi feito um gráfico de tensão superficial (mN/m) contra concentração (g/L), sendo o valor da CMC o ponto de descontinuidade no gráfico.

4.8.2 Determinação do Índice de Emulsificação em Diferentes Temperaturas e Concentrações de NaCl

Avaliou-se o índice de emulsificação, conforme descrito no item 4.7.1, para cada Experimento listado na TABELA 4 comparando-se soluções 4,0 g/L de biossurfatante impuro e purificado na mesma concentração. Este teste teve como objetivo avaliar a estabilidade do biossurfatante em condições de salinidade semelhantes à água do mar e em níveis superiores a esta salinidade, associadas a diferentes temperaturas conforme método adaptado de Abdel-Mawgoud, Aboulwafa, Hassouna, 2009. Para realização do ensaio, 2 mL da solução em estudo foi colocada em um tubo de ensaio coberto com papel alumínio que foi mantido em estufa por uma hora na temperatura teste. Após este período, o tubo de ensaio foi retirado deixando-se em repouso para retornar a temperatura ambiente. Verificou-se o nível da solução com o intuito de observar alguma perda sendo logo depois adicionado 2 mL de querosene de aviação para avaliação do índice de emulsificação.

4.8.3 Ensaio de tolerância ao cálcio

Avaliou-se o índice de emulsificação do querosene de aviação de soluções 4,0 g/L do biossurfatante impuro e purificado adicionadas de $CaCO_3$ em diferentes concentrações (0,1 g/L; 1,0 g/L e 10 g/L) conforme TABELA 5. Estas concentrações foram escolhidas devido à composição das rochas que acumulam petróleo, as quais são formadas, dentre outros componentes, de carbonato de cálcio em elevadas concentrações.

TABELA 4 Determinação do índice de emulsificação em diferentes temperaturas e concentrações de NaCl

Experimentos* (solução 4,0 g/L)	Salinidade (% NaCl)	Temperatura (°C)
1_I e 1_P	3,5	50
2_I e 2_P	3,5	50
3_I e 3_P	5,5	50
4_I e 4_P	5,5	50
5_I e 5_P	3,5	100
6_I e 6_P	3,5	100
7_I e 7_P	5,5	100
8_I e 8_P	5,5	100
9_I e 9_P	4,5	75
10_I e 10_P	4,5	75
11_I e 11_P	4,5	75
12_I e 12_P	0 (Controle)	100
13_I e 13_P	0 (Controle)	50
14_I e 14_P	0 (Controle)	75
15_I e 15_P	3,5 (Controle)	Tamb
16_I e 16_P	4,5 (Controle)	Tamb
17_I e 17_P	5,5 (Controle)	Tamb
18_I e 18_P	0 (Controle)	Tamb
19_I e 19_P	BRANCO água	Tamb
20_I e 20_P	BRANCO 3,5	Tamb
21_I e 21_P	BRANCO 4,5	Tamb
22_I e 22_P	BRANCO 5,5	Tamb

*I=impuro; P=purificado; Tamb=temperatura ambiente

TABELA 5 Ensaio de tolerância ao cálcio

Experimentos* (solução 4,0 g/L)	$CaCO_3$ (g/L)
1_I e 1_P	0,1
2_I e 2_P	1,0
3_I e 3_P	10

*I=impuro; P=purificado

4.8.4 Ensaio de índice do emulsificação de diferentes matérias primas

Avaliou-se o índice de emulsificação do querosene de aviação, biodiesel, hexano e óleo cru para soluções 4,0 g/L do biossurfatante impuro e purificado**.**

4.8.5 Ensaio de resistência a autoclavagem

Avaliou-se o índice de emulsificação do querosene de aviação para soluções 4,0 g/L do biossurfatante impuro e purificado antes e após autoclavagem (1,0 atm, $121^oC \pm 1^oC$ por 20 minutos).

4.8.6 Análise Espectrofotométrica na Região do Infravermelho com Transformada de Fourrier (FTIR)

A análise espectrofotométrica na região do infravermelho foi realizada no Laboratório de Apoio Instrumental (LAPIN 1) do Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano em espectrofotômetro FTIR - modelo 1720 X, da Perkin-Elmer (USA), controlado por computador digital DEC Station 320 X. Pastilhas de KBr foram preparadas, na proporção de 2 mg do biopolímero para 200 mg de KBr.

4.8.7 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise térmica foi realizada no Laboratório de Apoio Instrumental (LAPIN 1) do Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano, em analisador termogravimétrico modelo TGA Q-500, da TA Instruments (USA). A análise foi efetuada no intervalo entre 30ºC e 800ºC, em atmosfera inerte (nitrogênio) e taxa de aquecimento de 20ºC/minuto. O aparelho TGA-Q500 utiliza, aproximadamente,

vazão de nitrogênio de 40 mL/minuto na balança e 60 mL/minuto na amostra. Nesta análise foram obtidas curvas de perda de massa e a primeira derivada correspondente (DTA).

4.8.8 Análise de açúcares

A composição monossacarídica foi realizada no Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná. Realizou-se a hidrólise ácida total de amostras do biossurfatante purificado pesando em torno de 2 mg. A hidrólise foi feita com ácido tricloroacético 1,0 mol/L em tubo hermeticamente fechado a 100 ºC$\pm$1°C por um período de 5 horas. Após a hidrólise, o excesso de ácido foi evaporado. O material hidrolisado foi lavado com água destilada duas vezes que foi evaporada.

Os monossacarídeos resultantes da hidrólise ácida total foram reduzidos com borohidreto de sódio ($NaBH_4$) em temperatura ambiente por 16 horas em meio aquoso (WOLFROM e THOMPSON, 1963a). Íons hidreto (H^-) formados pelo agente redutor $NaBH_4$ reduzem os grupamentos carbonila dos monossacarídeos para formar alditóis. Após a redução do açúcar, o excesso do $NaBH_4$ foi eliminado pela adição de ácido acético glacial até o meio tornar-se ácido.

A solução foi filtrada com algodão sendo o filtrado evaporado até secura. Lavagens sucessivas foram feitas com metanol removendo o ácido bórico remanescente por co-destilação, na forma de borato de trimetila. Os alditóis secos resultantes foram acetilados com piridina (catalisador) e anidrido acético (agente de acetilação) (1:1, v / v) em tubos de hidrólise hermeticamente fechados por 16 horas a 25 ºC$\pm$1°C(WOLFROM; THOMPSON, 1963).

Este processo foi interrompido por adição de gelo moído ao Experimento e os acetatos de alditol foram extraídos com 1mL de clorofórmio. A piridina residual foi complexada com uma solução aquosa de sulfato de cobre ($CuSO_4$) a 5% (p/v). O complexo de cobre-piridina foi separado da fase de clorofórmio e eliminado por sucessivas lavagens com água destilada e $CuSO_4$.

A fase de clorofórmio contendo os acetatos de alditol foi coletada e seca. A amostra foi ressolubilizada em acetona para análise por cromatografia liquido -

gasosa (GLC). A análise por GLC foi realizada utilizando um modelo de cromatógrafo Hewlett Packard 5890 A Série II, com detector de ionização de chama (FID) e injetor com uma temperatura de 250°C; coluna capilar DB-210 (30m x 0,25 milímetros de diâmetro interno) com espessura do filme 0,25µm a 220°C e nitrogênio como gás de arraste com um fluxo de 2,0 mL/min (SLONEKER, 1972).

4.8.9 Análise Reológica

Foram preparadas soluções do biossurfatante recuperado impuro e purificado na concentração de 4,0 g/L cada uma. Para a completa dissolução das amostras cada solução 4,0 g/L foi mantida sob agitação durante 12 horas em temperatura ambiente e para completa dissolução, antes da leitura, a solução do biossurfatante puro foi aquecida a 60°C por cerca de uma hora. As medidas de viscosidade foram realizadas no reômetro AR 2000 (TA Instruments). A caracterização reológica foi determinada pelo cisalhamento contínuo na faixa de 1s^{-1} a 700s^{-1} em ciclos ascendentes e descendentes de taxas de deformação de 3 minutos cada (30°C).

CAPÍTULO 5

Resultados e Discussão

5.1 Avaliação das Variáveis de Resposta para o Teste com *Pseudomonas aeruginosa* em Função do Tempo de Fermentação

5.1.1 Índice de emulsificação (IE)

A TABELA 6 apresenta o sumário do desenho experimental, com os níveis inferior (-1), superior (+1) e central (0). Os valores reportados para o índice de emulsificação são os valores médios.

De acordo com a Figura 8 observa-se que os valores máximos para o índice de emulsificação estão no tempo de 72 horas. O maior valor obtido foi de 75% para o Experimento 8, onde os níveis são superiores para todos os parâmetros estudados.

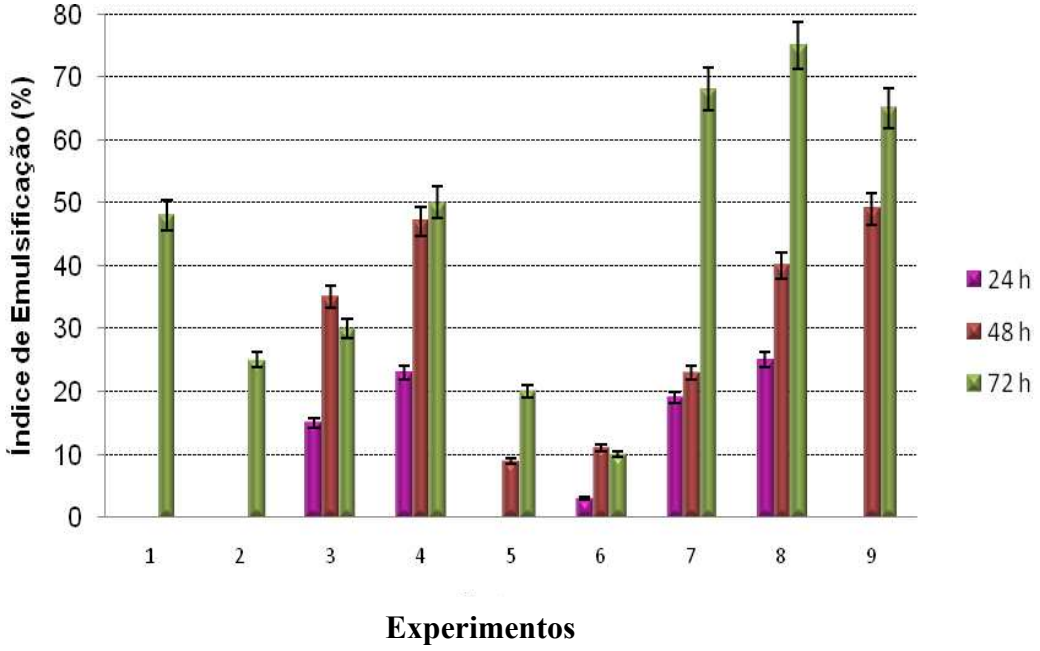
Para um estudo detalhado das influências dos parâmetros nesta resposta (IE) o tempo de 72 horas parece ser o mais apropriado, pois foi neste tempo que a atividade emulsificante apresentou os melhores resultados.

O índice de emulsificação é uma ferramenta simples e barata para a avaliação da produção de surfatantes. Silva *et al* (2010) investigaram a produção de biossurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 utilizando glicerol como substrato e verificaram que o índice de emulsificação para alguns compostos hidrofóbicos como óleo de soja, óleo de semente de algodão, benzeno, hexadecano, óleo de motor e petróleo. Os autores relataram que para este último houve uma emulsificação de 100% utilizando o caldo fermentado livre de células.

Vieira *et al* (2005) estudaram a produção de biossurfatante por duas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027 e PLAR) e verificaram que a variável que mais influenciou no aumento deste índice, que atingiu um valor máximo de 100% para a espécie ATCC 9027, foi a origem do micro-organismo em comparação a outros parâmetros estudados, tais como: concentração de óleo de soja residual (g/L), concentração de nitrato de amônio (g/L) e concentração de levedura cervejeira residual (g/L).

TABELA 6 Desenho experimental para o índice de emulsificação do querosene de aviação (IE)

Experimentos	A: pH	B: Concentração Inicial de Biomassa x 10^{-5}(g/L)	C: Concentração Inicial de Glicerol (g/L)	IE (%)		
				24 horas	48 horas	72 horas
1a e 1b	5,0 (-1)	3,1 (-1)	30,0 (-1)	0	0	48
2a e 2b	7,0 (+1)	3,1(-1)	30,0 (-1)	0	0	25
3a e 3b	5,0 (-1)	6,2 (+1)	30,0 (-1)	15	35	30
4a e 4b	7,0 (+1)	6,2 (+1)	30,0 (-1)	23	47	50
5a e 5b	5,0 (-1)	3,1(-1)	50,0 (+1)	0	9	20
6a e 6b	7,0 (+1)	3,1(-1)	50,0 (+1)	3	11	10
7a e 7b	5,0 (-1)	6,2 (+1)	50,0 (+1)	19	23	68
8a e 8b	7,0 (+1)	6,2 (+1)	50,0 (+1)	25	40	**75**
9a, 9b, 9c e 9d	6,0 (0)	4,7 (0)	40,0 (0)	0	49	65



Experimentos: **1:** A:5,0 (-1); B:3,1 x 10^{-5}(-1); C:30,0(-1). **2**: A:7,0(+1); B:3,1 x 10^{-5}(-1); C:30,0(-1). **3**: A: 5,0(-1); B:6,2 x 10^{-5}(+1); C:30,0(-1). **4**: A:7,0 (+1); B:6,2 x 10^{-5}(+1); C:30,0 (-1). **5**: A:5,0 (-1); B:3,1 x 10^{-5}(-1); C:50,0(+1). **6**: A:7,0(+1); B:3,1 x 10^{-5}(-1); C:50,0 (+1). **7**: A:5,0 (-1); B:6,2 x 10^{-5}(+1); C:50,0(+1). **8**: A:7,0(+1); B:6,2 x 10^{-5}(+1); C:50,0 (+1). **9:** A: 6,0(0); B:4,7 x 10^{-5}(0); C:40,0(0); onde A:pH; B: [Biomassa inicial] em g/L e C: [Glicerol inicial] em g/L.

Figura 8 Índice de emulsificação para querosene de aviação em função do tempo de fermentação para cada experimento. IE meio = 0,2%.

5.1.2 Consumo de glicerol

A TABELA 7 apresenta o sumário do desenho experimental, com os níveis inferior (-1), superior (+1) e central (0). Os valores reportados para consumo de glicerol são os valores médios.

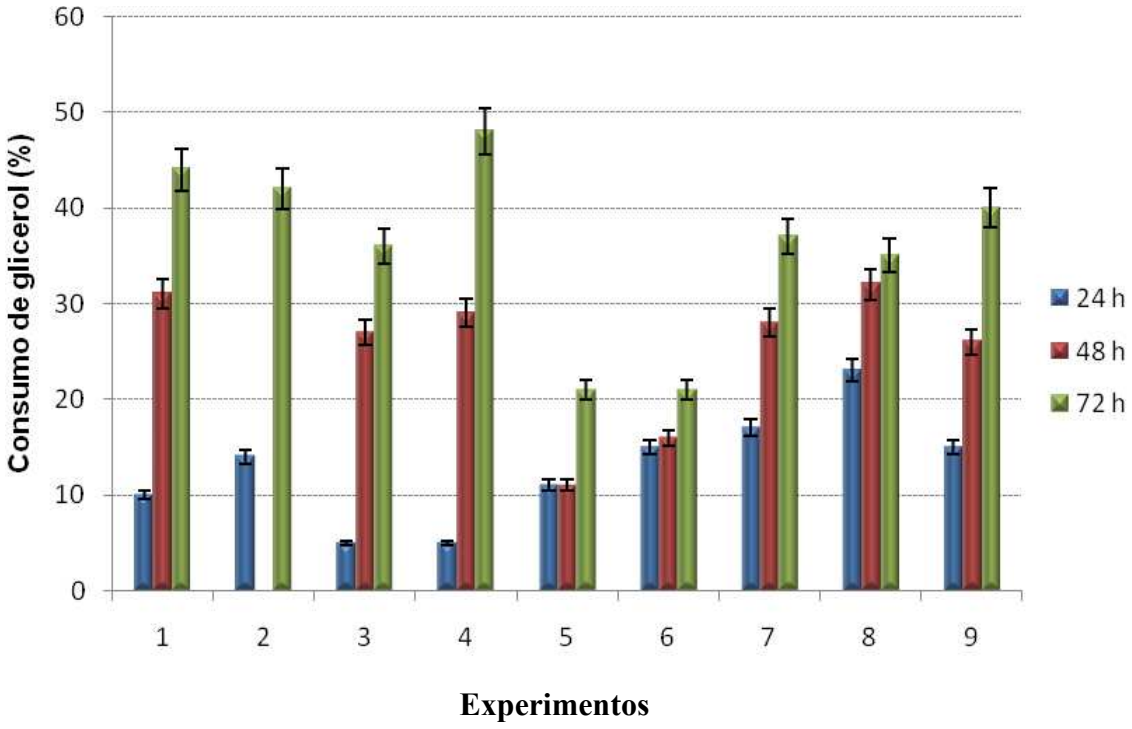
Conforme Figura 9, a maior parte dos valores máximos obtidos para o consumo de glicerol encontra-se no tempo de 72 horas de fermentação, onde o melhor valor foi 48 % de consumo, para níveis superiores, ou seja, pH=7,0, concentração inicial de biomassa (6,2 X 10^{-5}g/L) e inferior para concentração inicial de glicerol (30 g/L).

TABELA 7 – Desenho experimental para consumo de glicerol por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 (CG)

Experimentos	A: pH	B: Concentração Inicial de Biomassa x 10^{-5}(g/L)	C: Concentração Inicial de Glicerol (g/L)	CG (%)		
				24 horas	48 horas	72 horas
1a e 1b	5,0 (-1)	3,1 (-1)	30,0 (-1)	10	31	44
2a e 2b	7,0 (+1)	3,1 (-1)	30,0 (-1)	14	-	42
3a e 3b	5,0 (-1)	6,2 (+1)	30,0 (-1)	5	27	36
4a e 4b	7,0 (+1)	6,2 (+1)	30,0 (-1)	5	29	**48**
5a e 5b	5,0 (-1)	3,1(-1)	50,0 (+1)	11	11	21
6a e 6b	7,0 (+1)	3,1(-1)	50,0 (+1)	15	16	21
7a e 7b	5,0 (-1)	6,2 (+1)	50,0 (+1)	17	28	37
8a e 8b	7,0 (+1)	6,2 (+1)	50,0 (+1)	23	32	35
9a , 9b, 9c e 9d	6,0 (0)	4,7 (0)	40,0 (0)	15	26	40

Para a síntese de biossurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* a partir de hidrocarbonetos, foi sugerido que possam existir dois mecanismos. O primeiro é o aumento da solubilidade dos hidrocarbonetos e desse modo elevar a biodisponibilidade para a célula; e o segundo é a interação com a célula, fazendo com que a superfície celular torne-se mais hidrofóbica e se associe mais facilmente com substratos hidrofóbicos (MAIER e SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000). O glicerol é

solúvel em água e a fonte de carbono está diretamente em contato com a célula o que torna mais fácil a biodisponibilidade, possivelmente eliminando o primeiro mecanismo.



Experimentos: **1:** A:5,0 (-1); B:3,1 x 10^{-5}(-1); C:30,0(-1). **2**: A:7,0(+1); B:3,1 x 10^{-5}(-1); C:30,0(-1). **3**: A: 5,0(-1); B:6,2 x 10^{-5}(+1); C:30,0(-1). **4**: A:7,0 (+1); B:6,2 x 10^{-5}(+1); C:30,0 (-1). **5**: A:5,0 (-1); B:3,1 x 10^{-5}(-1); C:50,0(+1). **6**: A:7,0(+1); B:3,1 x 10^{-5}(-1); C:50,0 (+1). **7**: A:5,0 (-1); B:6,2 x 10^{-5}(+1); C:50,0(+1). **8**: A:7,0(+1); B:6,2 x 10^{-5}(+1); C:50,0 (+1). **9:** A: 6,0(0); B:4,7 x 10^{-5}(0); C:40,0(0); onde A:pH; B: [Biomassa inicial] em g/L e C: [Glicerol inicial] em g/L.

Figura 9 Consumo de glicerol por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 em função do tempo de fermentação para cada experimento.

5.1.3 Crescimento celular (biomassa final)

A TABELA 8 apresenta o sumário do desenho experimental, com os níveis inferior (-1), superior (+1) e central (0). Os valores reportados para o crescimento celular são os valores médios.

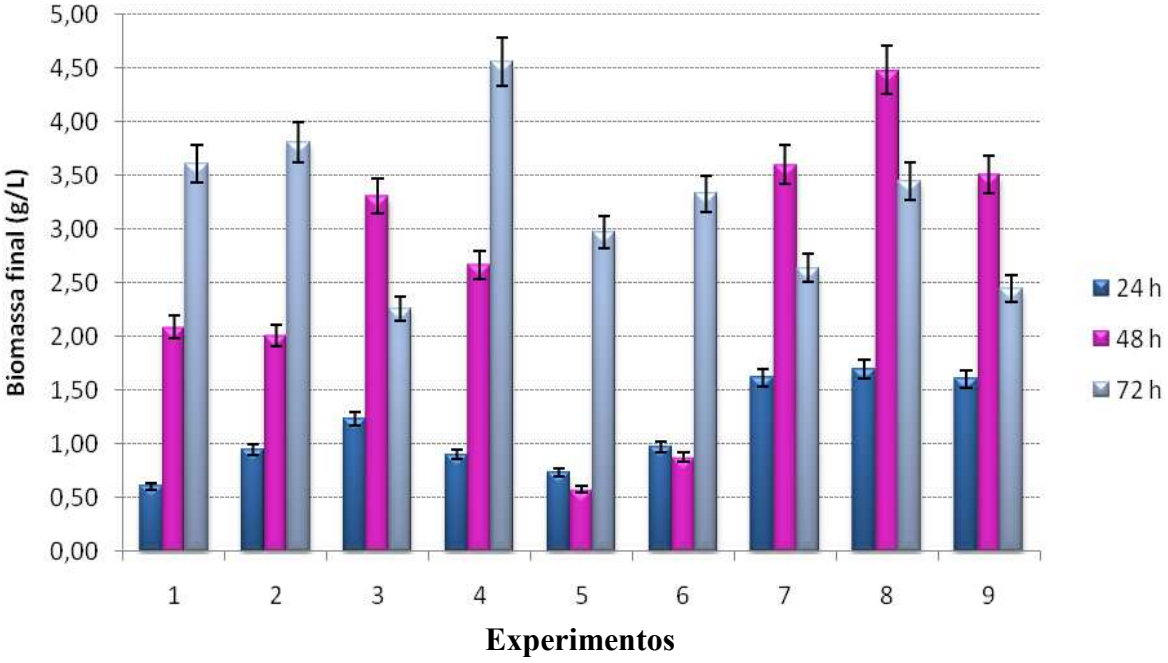
Através da Figura 10 observa-se que no tempo de fermentação de 72 horas os maiores valores para crescimento celular foram para os Experimentos 1, 2, 4, 5 e 6 onde a concentração de inicial de biomassa, em sua maioria, está no nível inferior. Para os Experimentos 3, 7, 8 e 9 os valores máximos de consumo foram obtidos em 48 horas de fermentação, havendo decréscimo após este intervalo de tempo.

Isto pode ser explicado pelo fato de que quando uma população microbiana é inoculada em um novo meio de cultura o crescimento geralmente não se inicia de imediato, a cultura passa por uma adaptação que não ocorre se esta for inoculada no mesmo meio. Esta fase é seguida de um crescimento exponencial, uma fase estacionária e por último uma fase de declínio ou morte (MADIGAN, 2004). Provavelmente os experimentos atingiram fases diferentes em relação aos tempos de experimento.

TABELA 8 Desenho experimental para crescimento celular (biomassa) de *Pseudomonas aeruginosa EQ 109* (Xf).

Experimentos	A: pH	B: Concentração de Biomassa Inicial x 10^{-5}(g/L)	C: Concentração Inicial de Glicerol (g/L)	Xf* (g/L)		
				24 horas	48 horas	72 horas
1a e 1b	5,0 (-1)	3,1 (-1)	30,0 (-1)	0,61	2,09	3,61
2a e 2b	7,0 (+1)	3,1 (-1)	30,0 (-1)	0,95	2,01	3,81
3a e 3b	5,0 (-1)	6,2 (+1)	30,0 (-1)	1,24	3,31	2,26
4a e 4b	7,0 (+1)	6,2 (+1)	30,0 (-1)	0,90	2,67	**4,56**
5a e 5b	5,0 (-1)	3,1 (-1)	50,0 (+1)	0,74	0,58	2,97
6a e 6b	7,0 (+1)	3,1(-1)	50,0 (+1)	0,97	0,88	3,33
7a e 7b	5,0 (-1)	6,2 (+1)	50,0 (+1)	1,62	3,60	2,64
8a e 8b	7,0 (+1)	6,2 (+1)	50,0 (+1)	1,70	4,48	3,45
9a , 9b, 9c e 9d	6,0 (0)	4,7 (0)	40,0 (0)	1,61	3,51	2,45

*Relação entre Absorvância $_{480nm}$ **:** peso seco g/L para *Pseudomonas areuginosa*: 37,25:6,75g/L.



Experimentos: **1:** A:5,0 (-1); B:3,1 x 10^{-5}(-1); C:30,0(-1). **2**: A:7,0(+1); B:3,1 x 10^{-5}(-1); C:30,0(-1). **3**: A: 5,0(-1); B:6,2 x 10^{-5}(+1); C:30,0(-1). **4**: A:7,0 (+1); B:6,2 x 10^{-5}(+1); C:30,0 (-1). **5**: A:5,0 (-1); B:3,1 x 10^{-5}(-1); C:50,0(+1). **6**: A:7,0(+1); B:3,1 x 10^{-5}(-1); C:50,0 (+1). **7**: A:5,0 (-1); B:6,2 x 10^{-5}(+1); C:50,0(+1). **8**: A:7,0(+1); B:6,2 x 10^{-5}(+1); C:50,0 (+1). **9:** A: 6,0(0); B:4,7 x 10^{-5}(0); C:40,0(0); onde A:pH; B: [Biomassa inicial] em g/L e C: [Glicerol inicial] em g/L.

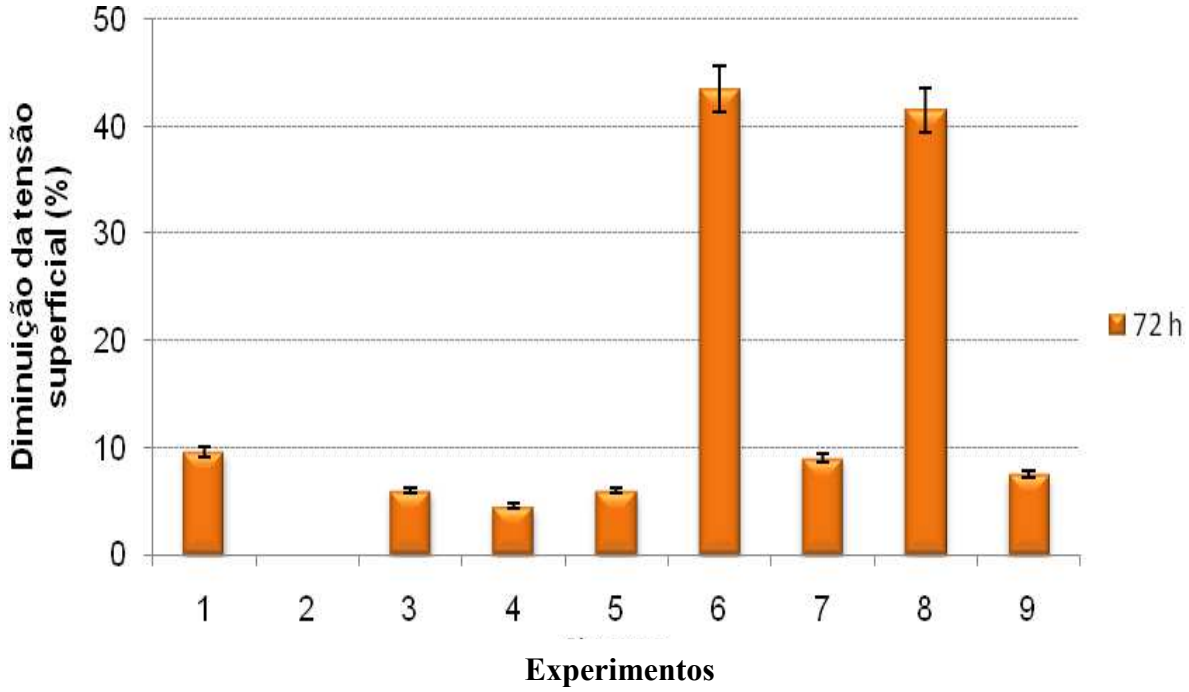
Figura 10 Crescimento celular de *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 em função do tempo de fermentação para cada experimento.

5.1.4 Diminuição da tensão superficial

A TABELA 9 apresenta o sumário do desenho experimental, com os níveis inferior (-1), superior (+1) e central (0). Os valores reportados para a diminuição da tensão superficial são os valores médios. Para este parâmetro foi feita análise somente no tempo de 72 horas.

TABELA 9 Desenho experimental para diminuição da tensão superficial por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 (DT)

Experimentos	A: pH	B: Concentração de Biomassa Inicial x 10^{-5}(g/L)	C: Concentração Inicial de Glicerol (g/L)	DT (%)
1a e 1b	5,0 (-1)	3,1 (-1)	30,0 (-1)	10
2a e 2b	7,0 (+1)	3,1(-1)	30,0 (-1)	0
3a e 3b	5,0 (-1)	6,2 (+1)	30,0 (-1)	6
4a e 4b	7,0 (+1)	6,2 (+1)	30,0 (-1)	5
5a e 5b	5,0 (-1)	3,1(-1)	50,0 (+1)	6
6a e 6b	7,0 (+1)	3,1(-1)	50,0 (+1)	**44**
7a e 7b	5,0 (-1)	6,2 (+1)	50,0 (+1)	9
8a e 8b	7,0 (+1)	6,2 (+1)	50,0 (+1)	**42**
9a , 9b, 9c e 9d	6,0 (0)	4,7 (0)	40,0 (0)	8



Experimentos: **1:** A:5,0 (-1); B:3,1 x 10^{-5}(-1); C:30,0(-1). **2**: A:7,0(+1); B:3,1 x 10^{-5}(-1); C:30,0(-1). **3**: A: 5,0(-1); B:6,2 x 10^{-5}(+1); C:30,0(-1). **4**: A:7,0 (+1); B:6,2 x 10^{-5}(+1); C:30,0 (-1). **5**: A:5,0 (-1); B:3,1 x 10^{-5}(-1); C:50,0(+1). **6**: A:7,0(+1); B:3,1 x 10^{-5}(-1); C:50,0 (+1). **7**: A:5,0 (-1); B:6,2 x 10^{-5}(+1); C:50,0(+1). **8**: A:7,0(+1); B:6,2 x 10^{-5}(+1); C:50,0 (+1). **9:** A: 6,0(0); B:4,7 x 10^{-5}(0); C:40,0(0); onde A:pH; B: [Biomassa inicial] em g/L e C: [Glicerol inicial] em g/L.

Figura 11 Diminuição da tensão superficial por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 em função dos experimentos .TS meio = 64,5 mN/m

De acordo com a Figura 11 os Experimentos 6 e 8 obtiveram os melhores resultados para a diminuição da tensão superficial, 44% e 42% respectivamente.

Ficou evidente que no tempo de 72 horas de fermentação, as respostas obtiveram os melhores resultados, o que pode ser melhor observado na TABELA 10.

TABELA 10 Respostas máximas no tempo de 72 horas de fermentação

Resposta	Experimento	Níveis			Valor máximo observado
		A	B	C	
Índice de emulsificação	8a e 8b	+1	+1	+1	75%
Consumo de glicerol	4a eb 4b	+1	+1	-1	48%
Crescimento celular	4a e 4b	+1	+1	-1	4,56 g/L
Diminuição da tensão superficial	6a e 6b	+1	-1	+1	44%
	2a e 2b	+1	+1	+1	42%

A TABELA 10 demonstra que as melhores respostas foram obtidas de Experimentos diferentes, fazendo-se necessária a análise estatística dos dados para a verificação das interações entre os parâmetros.

5.2 Análise Estatística dos Dados

Para que um experimento seja feito eficientemente, um caminho científico para planejar o experimento deve ser considerado. Através do desenho estatístico dos experimentos os dados são coletados e podem ser analisados por métodos estatísticos resultando em conclusões objetivas e válidas (MONTGOMERY, 2003). A essência de um bom planejamento consiste em projetar um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que procuramos.

A análise de variância (*Analysis of Variance*- ANOVA) é uma técnica usada para testar a igualdade das médias populacionais diferentes. Esse nome provém do fato de usar medidas relacionadas à variância para fazer inferências sobre médias populacionais. As técnicas de análise de variância também possuem suposição de que as amostras são aleatórias e que as populações sejam normalmente

distribuídas e possuam a mesma variância. Em um planejamento fatorial cada tentativa completa ou réplica do experimento, todas as combinações possíveis dos níveis dos fatores são investigadas (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

A análise do planejamento experimental foi feito utilizando o software *Design Expert 7.1.6™*, da Stat-Ease.

5.2.1 Índice de emulsificação

Com o planejamento experimental verificou-se a influência das variáveis independentes (pH, concentração inicial de biomassa e concentração inicial de glicerol) sobre os valores do índice de emulsificação, buscando definir as faixas ótimas de operação, que no caso maximizem esta resposta.

Uma descrição esquemática para avaliar esta resposta pode ser vista na Figura 12. O maior valor está destacado, podendo-se perceber que o efeito principal do fator A (pH), quando este passa do nível inferior para o superior há um aumento na resposta.

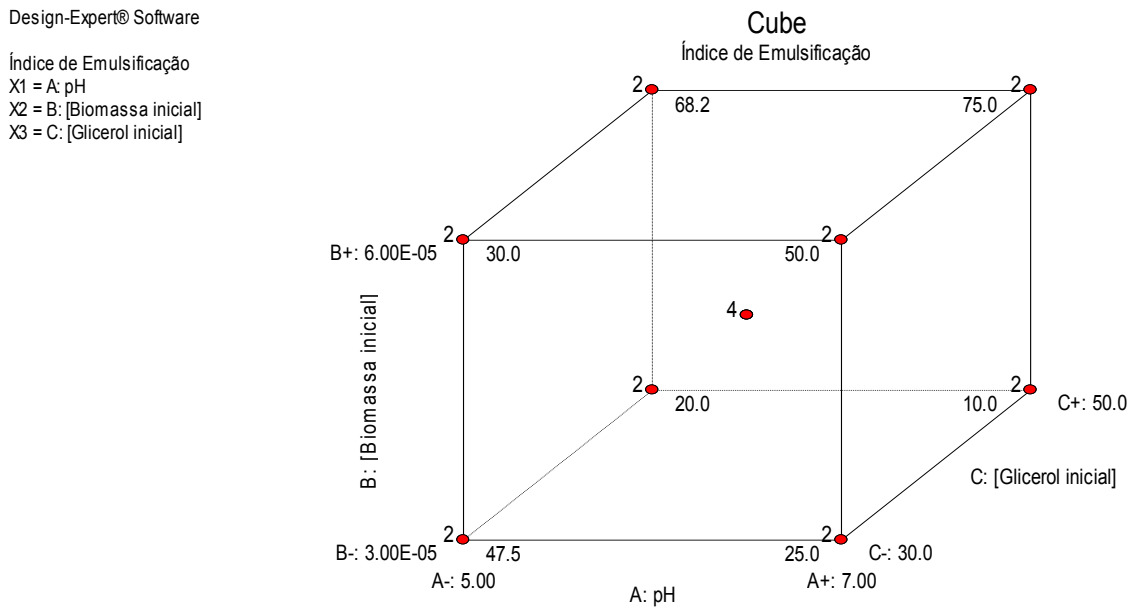


Figura 12 Representação esquemática para os resultados obtidos para o índice de emulsificação para querosene de aviação.

Antes de realizar a análise de variância é necessário verificar o gráfico de perturbação (Figura 13), o qual indica o que acontece com os parâmetros em relação à resposta. Quanto mais inclinada for a reta, mais influente é a variável independente, mostrando que a concentração inicial de biomassa foi a mais influente.

Os dados do planejamento fatorial foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) que está descrita na TABELA 11, pela qual se descreve o modelo, se verificam a variáveis que apresentam significância, assim como outros parâmetros.

Valores de p inferiores a 0,05 indicam que o modelo e os termos são significativos e valores inferiores a este, não são. Notou-se pela TABELA 10 que a curvatura possuía um valor de p inferior a 0,05, o que a tornou significativa. Isto quer dizer que a resposta é melhor descrita por um modelo não-linear, ou seja, há evidências que devam existir termos quadráticos no modelo. Isto significa que para esta resposta é necessário a existência de pontos axiais e o simples planejamento experimental de dois níveis com pontos centrais, não pode descrever um modelo quadrático, já que possui apenas um grau de liberdade. Apesar disto, a resposta pôde ser descrita por um modelo linear já que o valor de F de 21,15 fez com que o modelo apresentasse significância. Neste caso, B, AB, BC foram termos significativos do modelo. Se houverem muitos termos insignificantes no modelo (não contando os exigidos para apoiar a hierarquia), pode-se reduzir os termos, por isso retirou-se AC e ABC, aumentando-se o valor de F para 26,48.

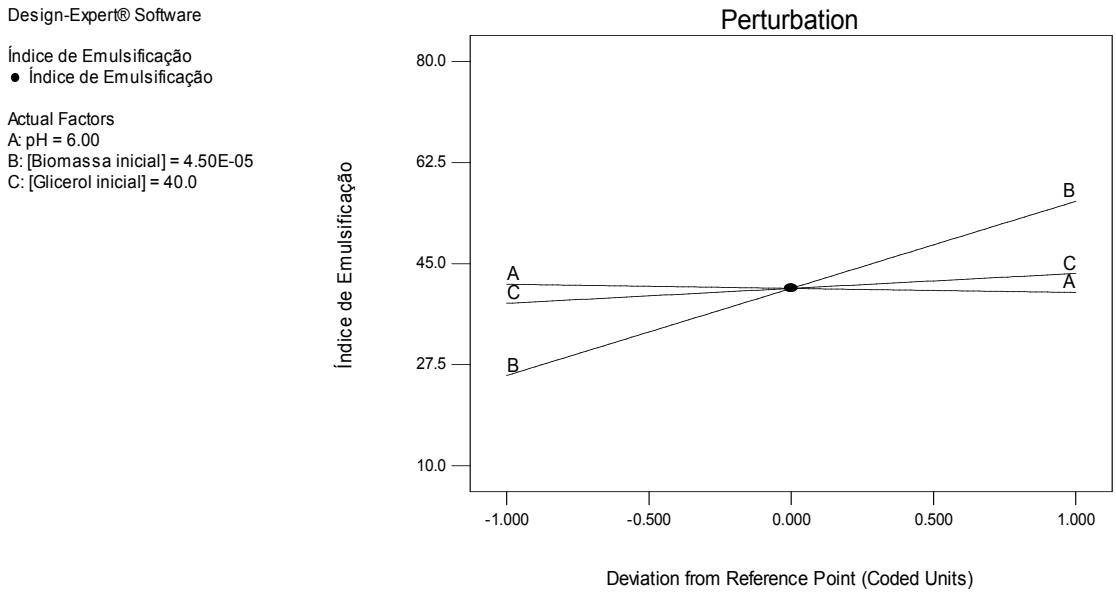


Figura 13 Gráfico de perturbação para o índice de emulsificação para querosene de aviação

O modelo matemático linear codificado para o índice de emulsificação foi dado pela Equação 2:

Índice de emulsificação (%): 40,71 + (-0,71A) + 15,09B + 2,59C + 7,41AB + (13,21BC) **(2)**

Observando-se os coeficientes dos termos no modelo, verificou-se que os sinais positivos de B e C mostraram que o aumento da concentração inicial de biomassa e da concentração inicial de glicerol promoveu o aumento do índice de emulsificação, enquanto que o aumento do pH (A) não foi significativo, pois possuiu um valor muito baixo.

O valor obtido para o quadrado do coeficiente de correlação confirmou que 91% da variabilidade dos dados se ajustaram ao modelo.

Avaliaram-se as interações entre os termos do modelo e os únicos termos que se interceptaram foram B e C, indicando que houve uma forte interação entre a concentração inicial de biomassa e a concentração inicial de glicerol, para um máximo na resposta, com pH 7,0. Isto pôde ser confirmado pelo gráfico de interação (Figura 14). Se as retas fossem paralelas o efeito de interação não seria importante.

TABELA 11 ANOVA completa para todos os termos no índice de emulsificação para querosene de aviação.

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de p
Modelo	7592,86	7	1084.69	21,15	**< 0,0001**
A	8,07	1	8.07	0,16	0,6992
B	3641,03	1	3641.03	70,99	**< 0,0001**
C	106,93	1	106.93	2,08	0,1766
AB	879,66	1	879.66	17,15	**0,0016**
AC	0,12	1	0.12	2,27e-03	0,9629
BC	2792,16	1	2792.16	54,44	**< 0,0001**
ABC	164,89	1	164.89	3,21	0,1005
Curvatura	1809,32	1	1809.32	35,28	< 0,0001
Erro puro	564,19	11	51.29		
Total	9966,37	19			

A= pH; B= Concentração inicial de biomassa; C= Concentração inicial de glicerol

No Diagrama de Pareto (Figura 15), o qual mostrou os efeitos negativos e os efeitos positivos ao nível de confiança de 95%, verificou-se que os parâmetros que mais influenciaram no índice de emulsificação foram a concentração inicial de biomassa (B), a interação concentração inicial de biomassa/concentração inicial de glicerol (BC) e a interação pH/concentração inicial de biomassa (AB). Estes três são efeitos positivos, ou seja, quando estes parâmetros passaram de um nível superior (+1) para um nível inferior (-1) o índice de emulsificação foi reduzido.

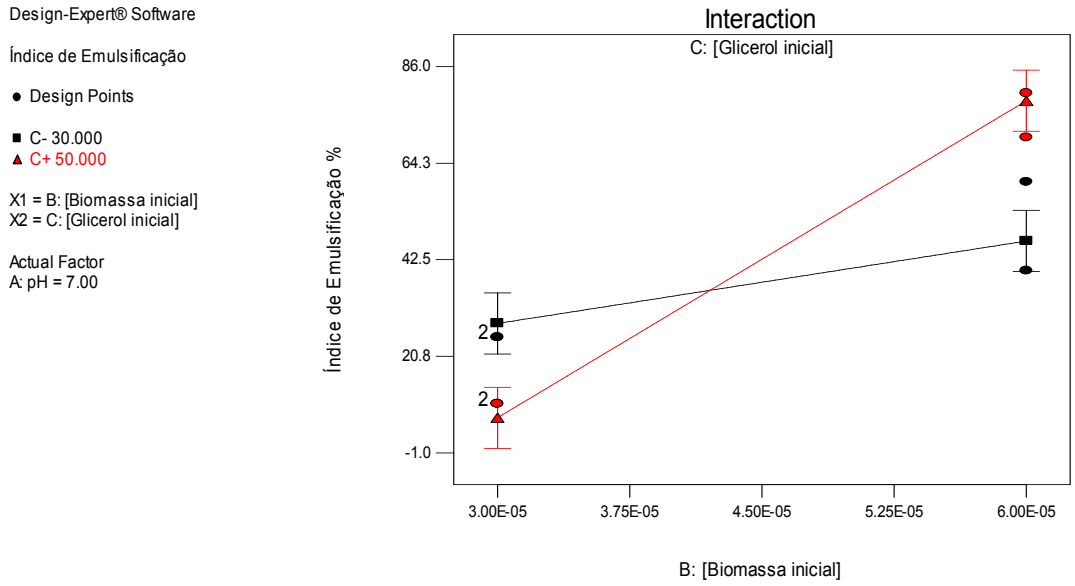


Figura 14 – Interação entre concentração de biomassa inicial e concentração inicial de glicerol para a variável de resposta índice de emulsificação para querosene de aviação em pH 7,0.

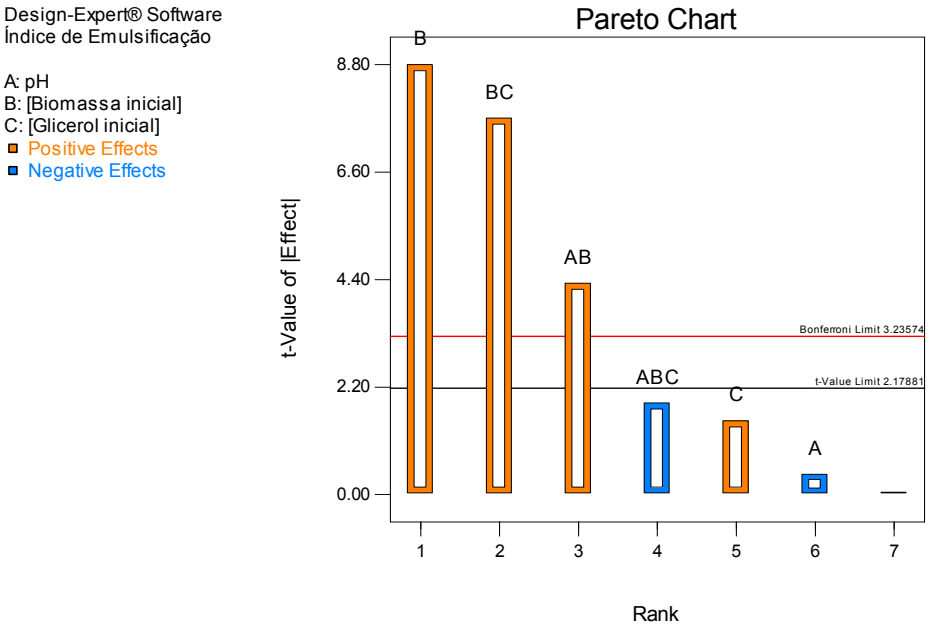


Figura 15 Diagrama de Pareto mostrando a contribuição das variáveis estudadas para o índice de emulsificação.

5.2.2 Consumo de glicerol

Com o planejamento experimental verificou-se a influência das variáveis independentes (pH, concentração inicial de biomassa e concentração inicial de glicerol) sobre os valores do consumo de glicerol, buscando definir as faixas ótimas de operação, ou seja, faixas que maximizem a resposta.

Uma descrição esquemática para avaliar esta resposta pode ser vista na Figura 16. Os maiores valores estão localizados na face do cubo que possui nível inferior para C (concentração inicial de glicerol), indicando que uma menor concentração inicial de glicerol produz um maior consumo deste.

Os dados do planejamento fatorial também foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) que está descrita na TABELA 12.

O valor de F de 8, 86 mostrou que o modelo foi significativo e a curvatura não, podendo ser descrito linearmente. B, C e BC são os termos significativos. Para melhor descrevê-lo retirou-se AB, AC e ABC, aumentando-se o valor de F para 11,98.

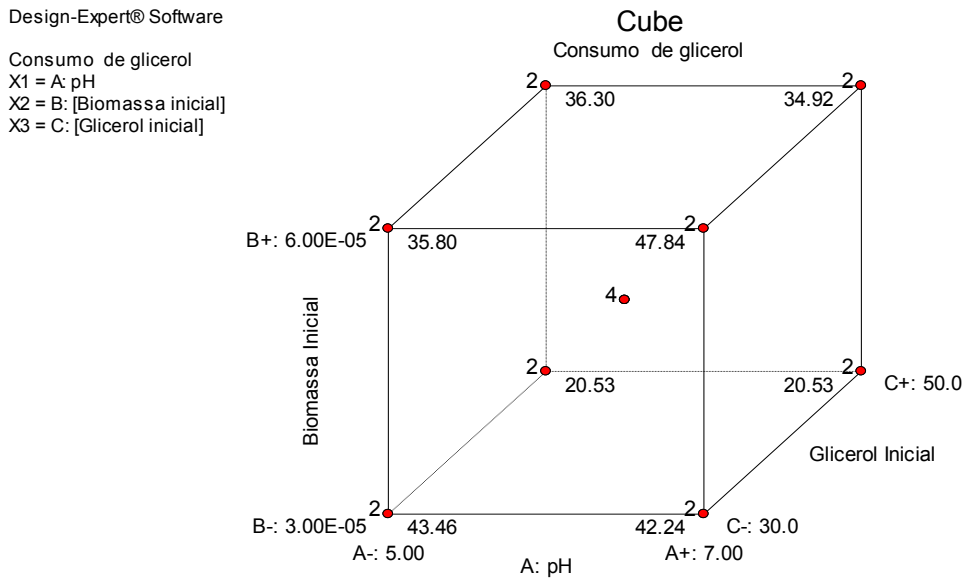


Figura 16 Representação esquemática para os resultados obtidos para o consumo de glicerol.

O modelo matemático codificado para o consumo de glicerol foi dado pela Equação 3:

Consumo de glicerol % = + 35,20 + 1,18A + 3,51B + (- 7,13C) + (-1,53AC) + 4,03BC (3)

Observando-se os coeficientes dos termos no modelo, verificou-se que os sinais positivos de A e B mostraram que o aumento do pH e da concentração inicial de biomassa promoveu o aumento do consumo de glicerol, enquanto que o aumento da concentração inicial de glicerol (C) diminuiu este consumo.

O valor obtido para o quadrado do coeficiente de correlação confirmou que 78% da variabilidade dos dados se ajustam ao modelo.

TABELA 12 ANOVA para todos os termos de consumo de glicerol

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de p
Modelo	1418,92	7	202,70	**8,86**	**0,0009**
A	22,22	1	22,22	0,97	0,3455
B	197,23	1	197,23	8,62	**0,0135**
C	814,02	1	814,02	35,58	**<0,0001**
AB	35,23	1	35,23	1,54	0,2404
AC	37,22	1	37,22	1,63	0,2284
BC	259,37	1	259,37	11,34	**0,0063**
ABC	53,63	1	53,63	2,34	0,1540
Curvatura	69,26	1	69,26	3,03	0,1098
Erro puro	251,67	11	22,88		
Corr Total	1739,85	19			

A= pH; B= Concentração inicial de biomassa; C= Concentração inicial de glicerol

Para o consumo de glicerol não houve a interseção entre os parâmetros, por isso decidiu-se mostrar o gráfico do termo significante BC. Este gráfico indicou que quando C está em um nível inferior o aumento da biomassa não influenciou o consumo de glicerol, porém quando C está em um nível superior o aumento da

biomassa promoveu o aumento do consumo. Isto pôde ser confirmado pelo gráfico de interação (Figura 17).

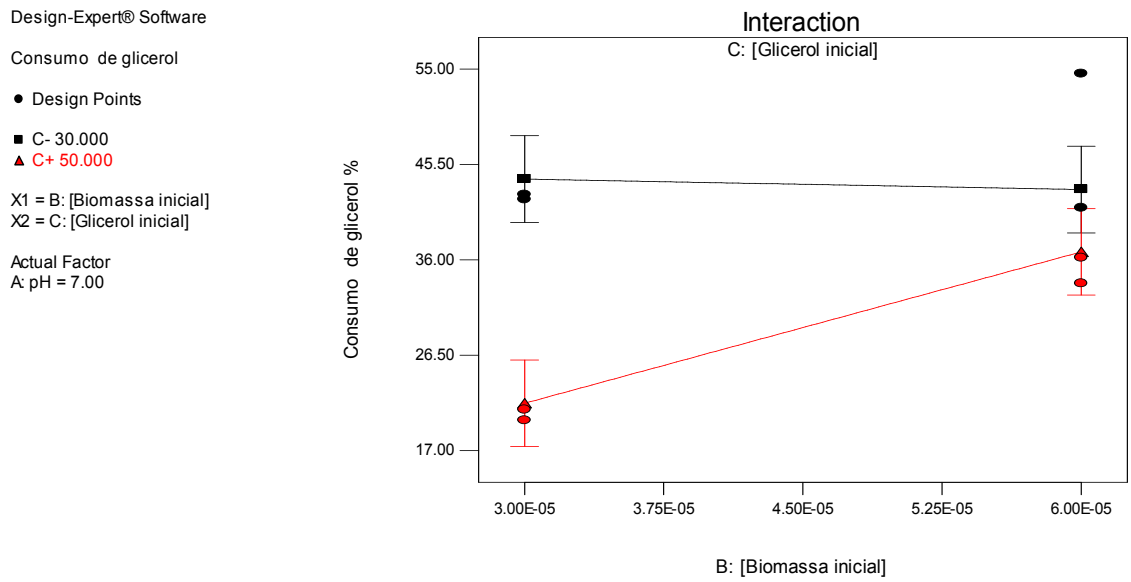


Figura 17 Interação entre concentração inicial de biomassa e concentração inicial de glicerol para a variável de resposta consumo de glicerol em pH 7,0.

No Diagrama de Pareto (Figura 18), verificou-se que os parâmetros que influenciaram no consumo de glicerol foram a concentração inicial de glicerol (C), o termo concentração inicial de biomassa/concentração inicial de glicerol (BC) e a concentração inicial de biomassa (B), respectivamente. Para a concentração inicial de glicerol, observou-se um efeito negativo, ou seja, quando a este parâmetro passou de um nível superior (+1) para um nível inferior (-1) a resposta (consumo de glicerol) foi aumentada.

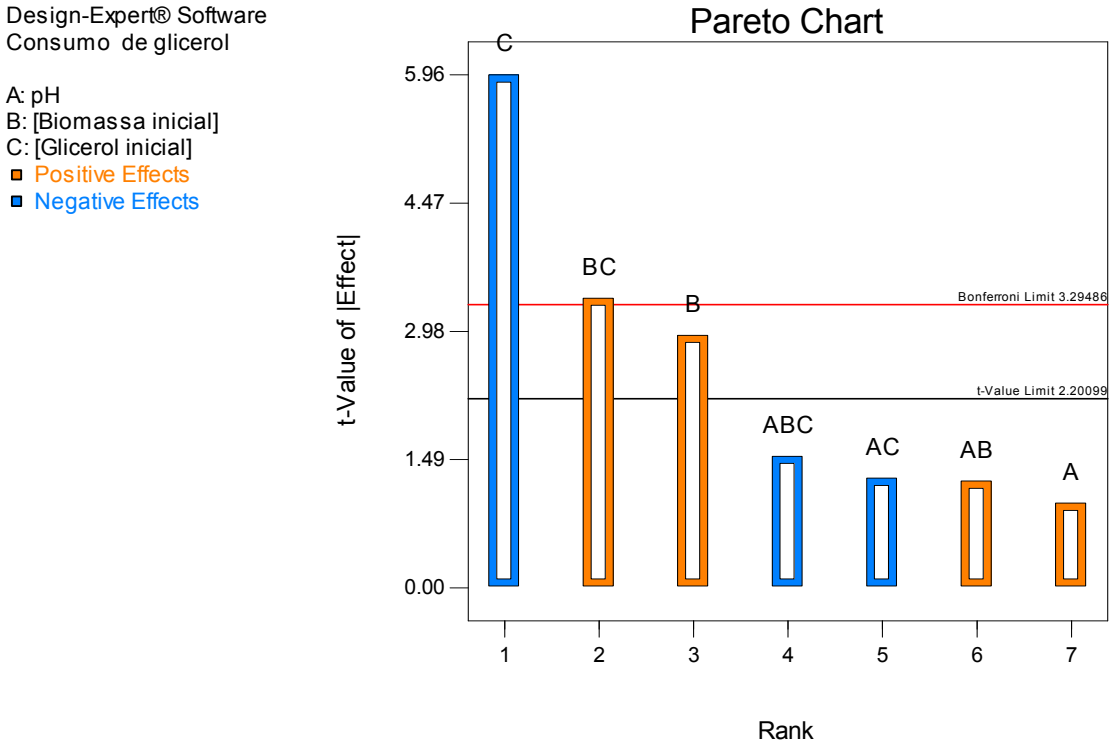


Figura 18 Diagrama de Pareto mostrando a contribuição dos parâmetros estudados para o consumo de glicerol.

5.2.3 Diminuição da tensão superficial

Com o planejamento experimental verificou-se a influência das variáveis independentes (pH, concentração inicial de biomassa e concentração inicial de glicerol) sobre os valores da diminuição da tensão superficial, buscando definir as faixas ótimas de operação, ou seja, faixas que maximizem a resposta.

Uma descrição esquemática para avaliar esta resposta pode ser vista na Figura 19. O maior valor está destacado e se situa onde todos os níveis são superiores, como valor de 43,4%.

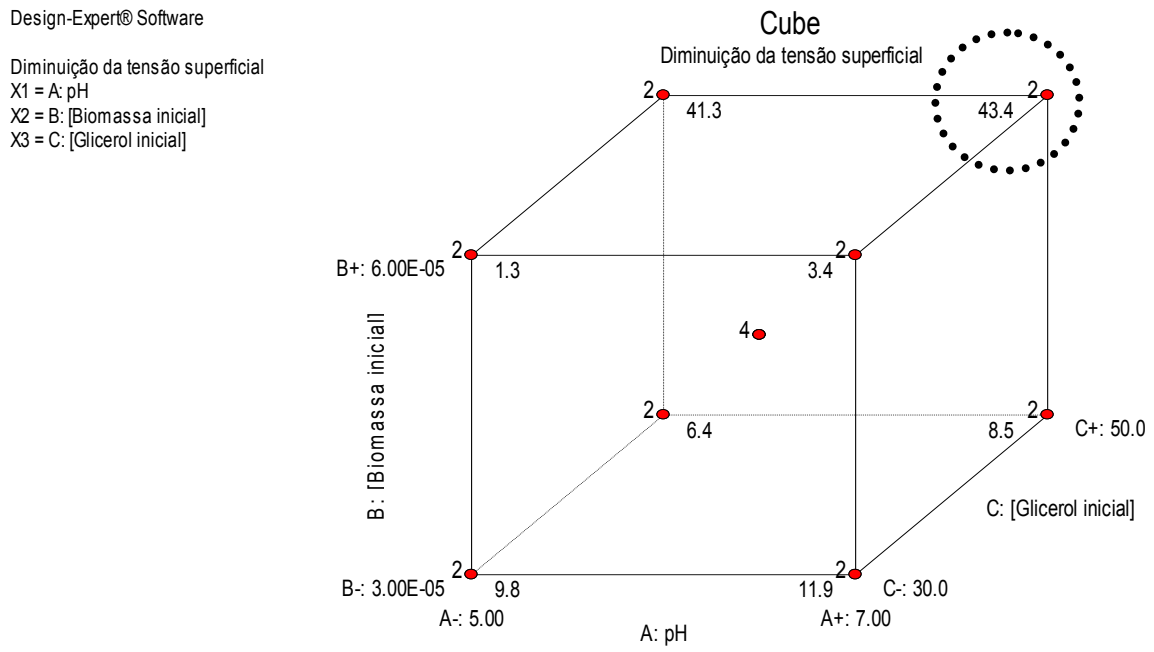


Figura 19 Representação esquemática dos resultados experimentais para diminuição da tensão superficial pH 7,0.

Os dados do planejamento fatorial também forma submetidos a uma análise de variância (ANOVA) que está descrita na TABELA 13.

O valor de F de 49,45 implica o modelo é significativo, porém a curvatura possui um valor de p inferior a 0,05 indicando que a resposta pode ser melhor descrita por um modelo quadrático. B, C e BC são termos significativos do modelo. Para melhorar o modelo retirou-se AB, AC e ABC, aumentando-se o valor de F para 90,90.

O modelo matemático codificado para a diminuição da tensão superficial foi dado pela Equação 4:

$$\textbf{Diminuição da tensão superficial \%} = + 15{,}76 + 1{,}05A + 6{,}61B + 9{,}14C + 10{,}89BC \qquad \textbf{(4)}$$

Observando-se os coeficientes dos termos no modelo, verificaram-se sinais positivos para os três parâmetros estudados, mostrando que o aumento destes promoveu o aumento da diminuição da tensão superficial.

O valor obtido para o quadrado do coeficiente de correlação confirma que 96% da variabilidade dos dados se ajustam ao modelo.

TABELA 13 ANOVA para todos os termos do modelo da diminuição da tensão superficial

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de p
Modelo	3974,40	7	567,77	49,45	**< 0.0001**
A	17,66	1	17,66	1,54	0,2407
B	698,99	1	698,99	60,88	**< 0.0001**
C	1336,25	1	1336,25	116,38	**< 0.0001**
AB	2,96	1	2,96	0,26	0,6217
AC	8,25	1	8,25	0,72	0,4147
BC	1895,76	1	1895,76	165,11	**< 0.0001**
ABC	14,53	1	14,53	1,27	0,2845
Curvatura	1685,98	1	1685,98	146,84	**< 0,0001**
Erro puro	126,30	11	11,48		
Corr Total	5786,68	19			

A= pH; B= Concentração inicial de biomassa; C= Concentração inicial de glicerol

Avaliaram-se as interações entre os termos do modelo e os únicos termos que se interceptaram foram B e C, indicando que os fatores que mais influenciaram na diminuição da tensão superficial foram a concentração inicial de biomassa e a concentração inicial de glicerol, mantendo–se o pH=7,0. Isto pôde ser confirmado pelo gráfico de interação (Figura 20). Se as retas fossem paralelas o efeito de interação não seria importante.

No Diagrama de Pareto (Figura 21), verificou-se que os parâmetros que influenciaram no consumo de glicerol foram a concentração inicial de biomassa/concentração inicial de glicerol (BC), a concentração inicial de glicerol (C) e a concentração inicial de biomassa (B), respectivamente. Estes três efeitos foram positivos, ou seja, quando estes parâmetros passaram de um nível superior (+1) para um nível inferior (-1) a resposta foi reduzida.

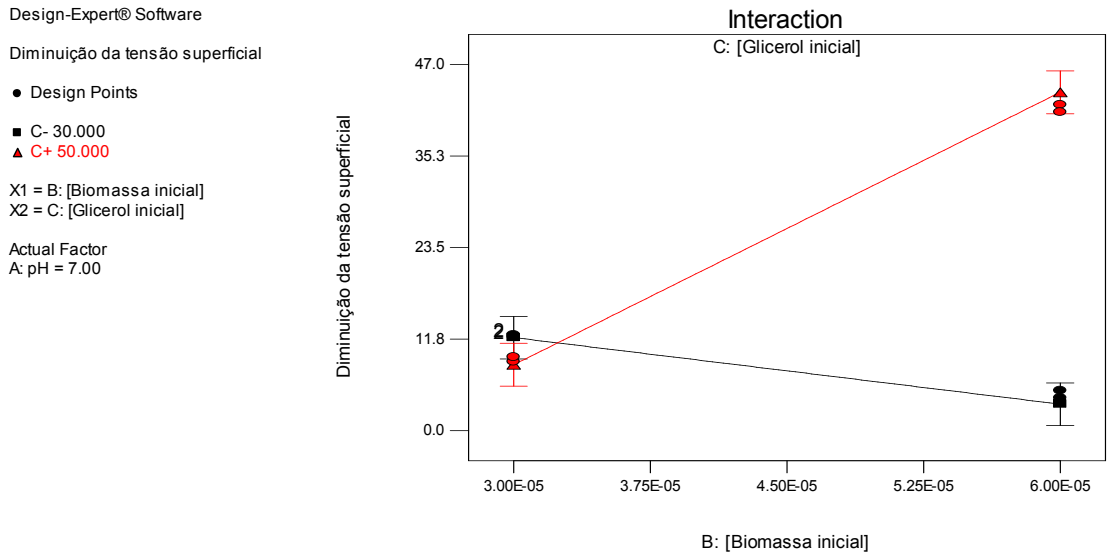


Figura 20 Interação entre concentração inicial de biomassa e concentração inicial de glicerol para a variável de resposta diminuição da tensão superficial, com pH 7,0.

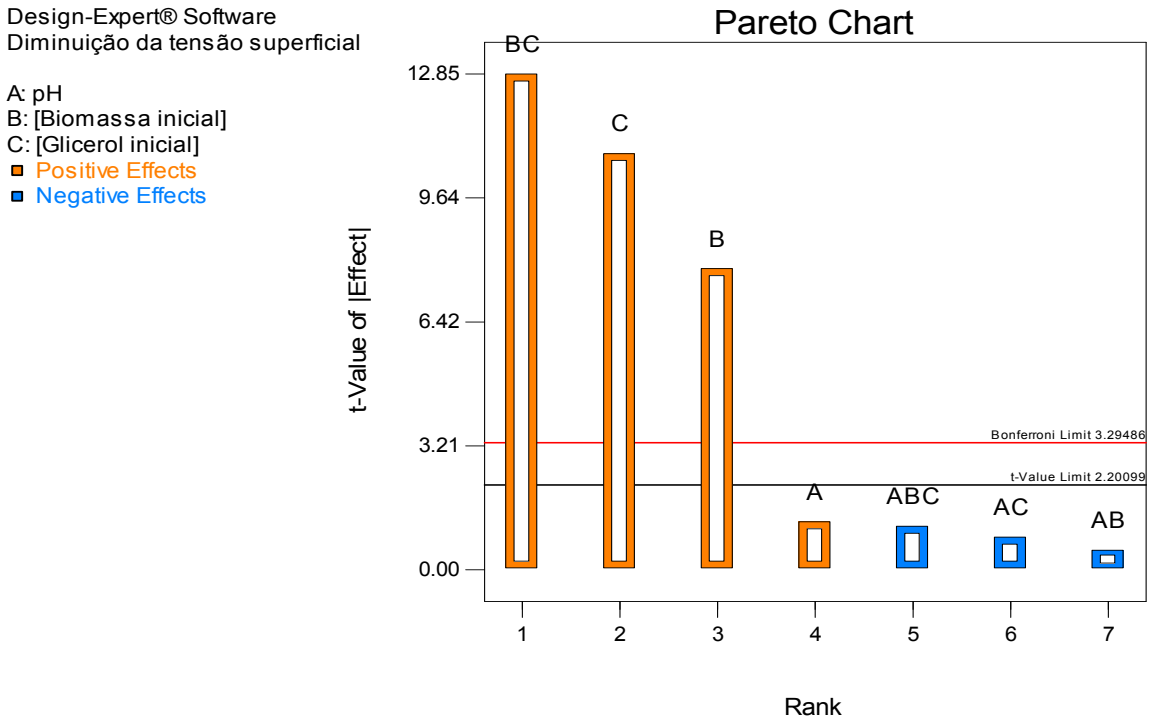


Figura 21 Diagrama de Pareto mostrando a contribuição dos parâmetros estudados para a diminuição da tensão superficial.

5.2.4 Crescimento celular (biomassa final)

Com o planejamento experimental verificou-se a influência das variáveis independentes (pH, concentração inicial de biomassa e concentração inicial de glicerol) sobre os valores do crescimento celular, buscando definir as faixas ótimas de operação, ou seja, faixas que maximizem a resposta.

O modelo matemático codificado para o crescimento celular não foi considerado significativo, apesar da redução dos termos não significativos do modelo e até mesmo da implantação de transformadas como logaritmos na base 10 e logaritmo neperiano (Ln), os quais reduzem o erro no cálculo.

O valor obtido para o quadrado do coeficiente de correlação confirma que apenas 50% da variabilidade dos dados se ajustaram ao modelo.

Os dados do planejamento fatorial também foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), obtendo-se um valor de F igual a 1,56, mostrando que o modelo não foi significativo.

Avaliaram-se as interações entre os termos do modelo e os únicos termos que se interceptaram foram A e B, indicando que os fatores que influenciaram o crescimento celular foram, principalmente, o pH e a concentração inicial de biomassa, com concentração inicial de glicerol igual a 40g/L. Isto pôde ser confirmado pelo gráfico de interação (Figura 22).

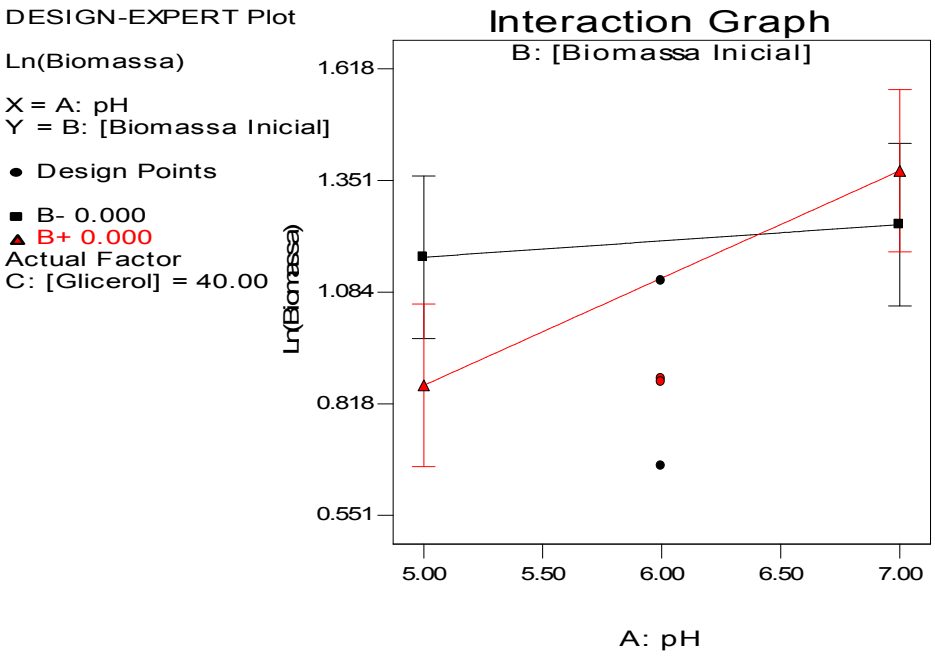


Figura 22 Interação entre concentração inicial de biomassa e concentração inicial de glicerol para a variável de resposta diminuição da tensão superficial.

No Diagrama de Pareto (Figura 23), o qual mostrou os efeitos negativos e os efeitos positivos ao nível de confiança de 95%, verificou-se que os parâmetros não foram significativos.

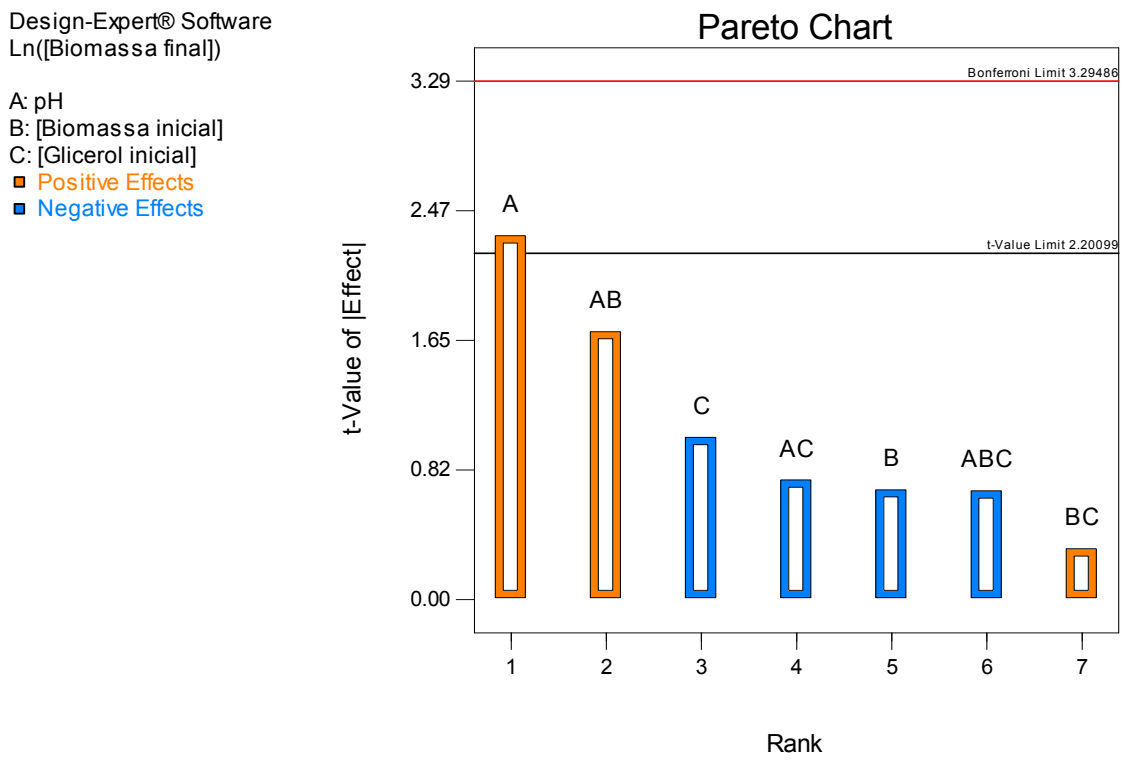


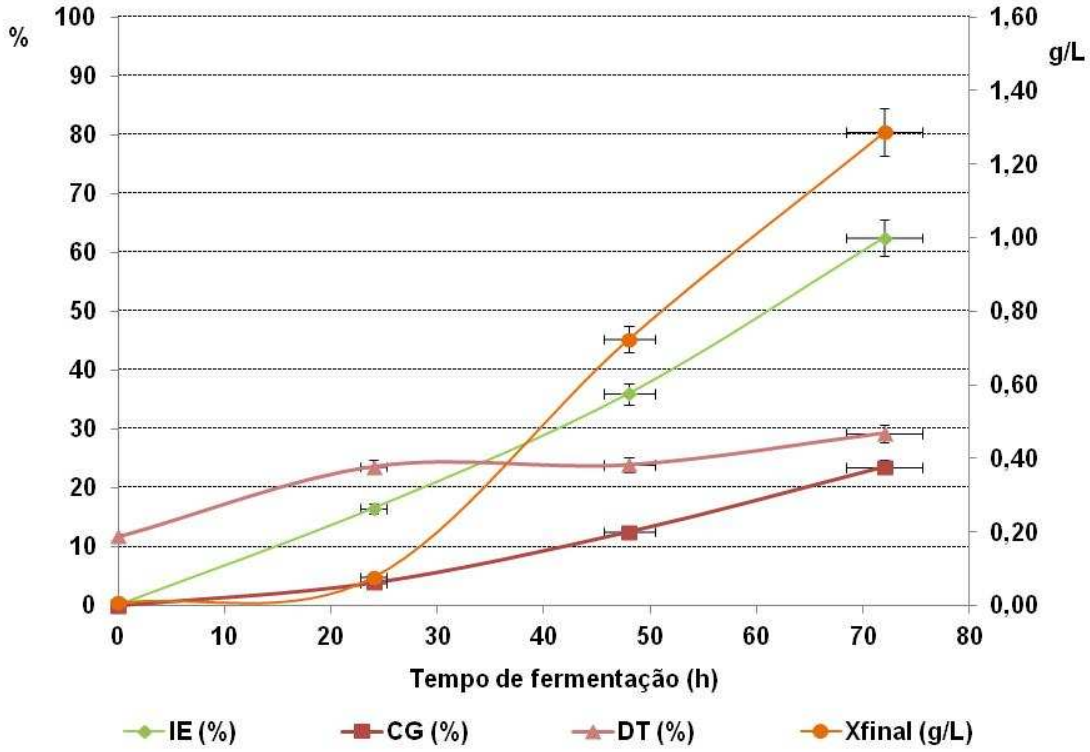
Figura 23 Diagrama de Pareto mostrando a contribuição dos parâmetros estudados para o crescimento celular.

5.3 Precipitação com Etanol: Análise qualitativa

O precipitado formado apresentou uma coloração levemente rosada, sendo produzida uma maior quantidade nos experimentos com nível superior do pH (+1). As características físicas e químicas do precipitado formado serão discutidas posteriormente.

5.4 Produção de Biossurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 em Fermentador: Fase I

Os melhores resultados para os parâmetros estudados neste experimento foram verificados no tempo de 72 horas de fermentação, como mostra a Figura 24. As análises foram feitas com o líquido fermentado livre de células. Este experimento foi realizado em duplicata e os resultados reportados representam a média dos valores nas respostas.



IE:índice de emulsificação do querosene de aviação; CG; Consumo de glicerol; DT; Diminuição da tensão superficial; X final: Biomassa final.

Figura 24 Respostas estudadas em função do tempo de fermentação para *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109. Concentração inicial de glicerol = 50g/L; pH 7,0; inóculo inicial =6,2x10^{-5} g/L; Tensão do meio= 69 mN/m; Máximos em 72 horas: IE do querosene de aviação: 63%, DT: 29%; Xfinal: 1,29g/L e CG: 24% .

De acordo com a Figura 24 observou-se que a diminuição da tensão superficial não obteve alterações significativas a partir de 24 horas de fermentação. Isto pode ser devido ao fato da concentração do biossurfatante no meio já estar acima da CMC (concentração micelar crítica que será discutida posteriormente) onde há formação de micelas no interior da solução, as quais não provocam mais variações na tensão superficial (DALTIN, 2011).

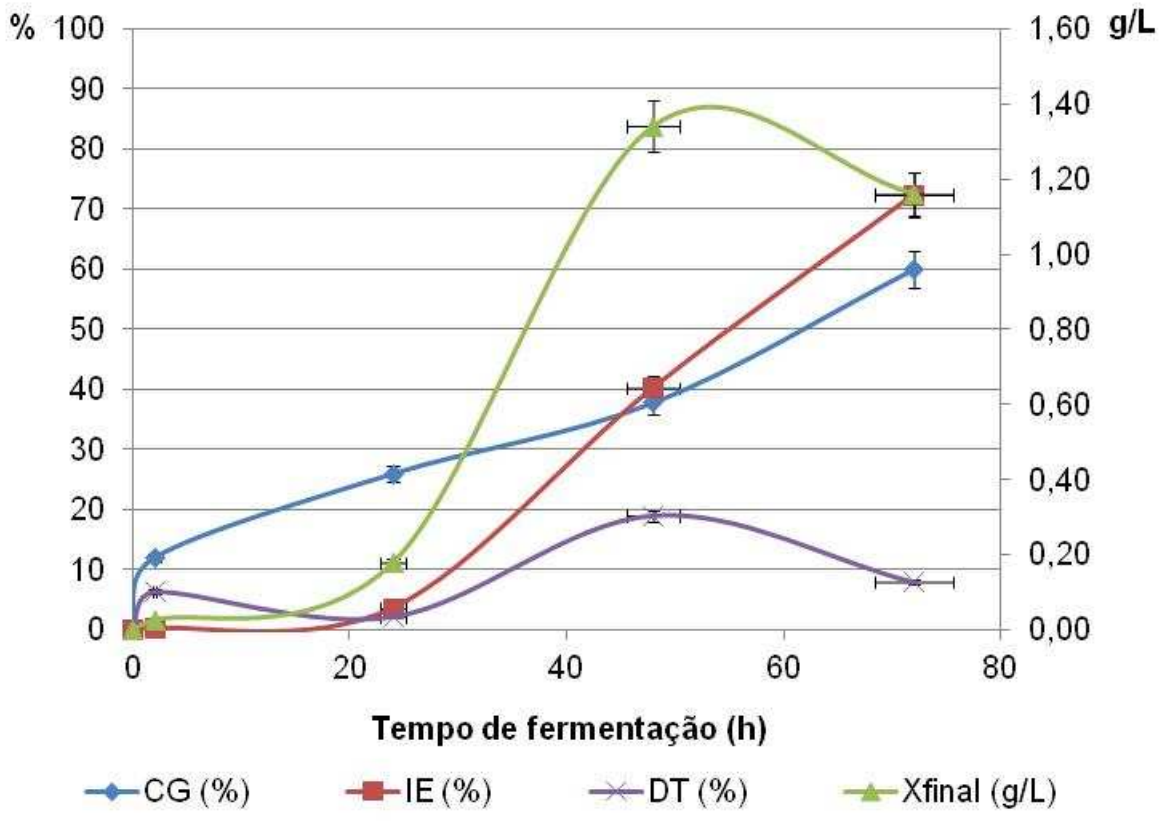
O índice de emulsificação do querosene de aviação assim como a biomassa aumentaram gradativamente até atingir um máximo de 60% e 1,20 g/L, respectivamente. Oliveira *et al* (2006) investigaram a produção de biossurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* utilizando óleo de dendê como fonte de carbono. Os

autores verificaram que o a emulsificação atingiu um valor de 100% quando utilizado óleo diesel.

5.5 Produção de Biossurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109em Fermentador: Fase II

Após teste preliminares verificou-se a necessidade do controle do pH. Segundo a Figura 25 foi confirmado que para os parâmetros estudados neste experimento 72 horas de fermentação ainda é o melhor intervalo para produção do biossurfatante, pois é onde os resultados apresentam máximos. Este experimento foi realizado em duplicata e os resultados reportados representam a média dos valores nas respostas.

Neste teste notou-se que a concentração de biomassa aumentou alcançando um máximo de 1,37 g/L em cerca de 50 horas de fermentação. A queda da biomassa pode representar uma fase de declínio ou morte de células bacterianas. O gráfico de oxigênio dissolvido em função do tempo de fermentação confirma isto (Figura 26). Conforme esta figura a % de oxigênio dissolvido (%OD) no meio de produção no início do experimento é elevada e reduz até cerca de 30 horas de fermentação, indicando que há consumo do oxigênio de entrada (fase de crescimento). Quando este valor é zero todo o oxigênio que entra no sistema é consumido pelos micro-organismos (fase estacionária). Após quase 50 horas de fermentação a %OD volta a aumentar, ou seja, não há mais consumo de todo o oxigênio apontando declínio ou morte celular, mas o biossurfatante continua sendo produzido.



IE:índice de emulsificação do querosene de aviação; DT; Diminuição da tensão superficial; CG; Consumo de glicerol;; X final: Biomassa final.

Figura 25 – Parâmetros estudados em função do tempo de fermentação para *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109. Concentração inicial de glicerol = 50g/L; pH=7,0; inóculo inicial= $6,2x10^{-5}$ g/L; Tensão do meio= 69 mN/m. Máximos em 72 horas: IE do querosene de aviação: 72%, DT: 19%, CG: 60% . Máximo para Xfinal em 48 horas: 1,37 g/L.

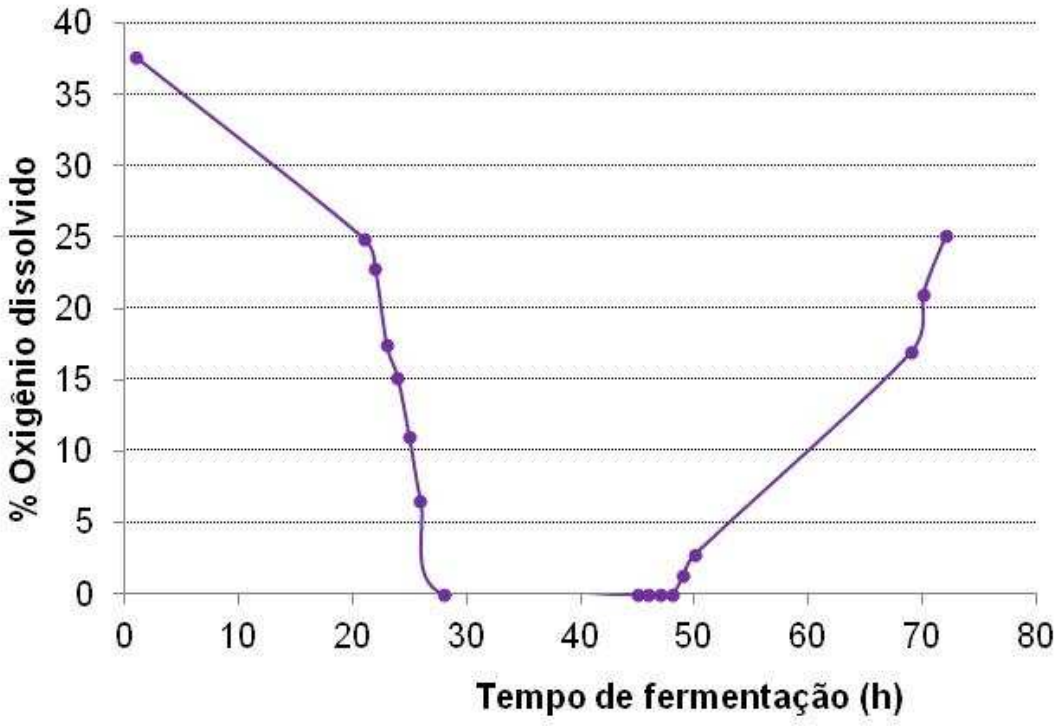


Figura 26 – Oxigênio dissolvido em função do tempo de fermentação para produção de biossurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109.

Após a extração do biossurfatante este foi seco e pesado para o cálculo do rendimento em relação à biomassa, do rendimento em relação ao substrato e da produtividade volumétrica no tempo de fermentação de 72 horas, segundo as equações:

- Rendimento em relação a biomassa:

$$Y\left(\frac{X}{S}\right) = \frac{X - X0}{S0 - S} = 0{,}058 \text{ g de biomassa/g de substrato} \quad (5)$$

- Rendimento em relação ao produto:

$$Y\left(\frac{P}{S}\right) = \frac{P - P0}{S0 - S} = 0{,}68 \text{ g de produto/g de substrato} \quad (6)$$

- Produtividade volumétrica:

$$P = \frac{P - P0}{t\,.V} = 0{,}19 \text{ g de produto. } L^{-1}.h^{-1} \quad (7)$$

onde X é a concentração final de biomassa em g/L; X_0 a concentração inicial de biomassa em g/L; S_0 a concentração inicial de substrato em g/L; S a concentração

final de substrato em g/L; P_0 a concentração inicial de produto em g/L; P a concentração final de produto em g/L; V o volume de meio e t o tempo de fermentação.

5.6 Caracterização do Biossurfatante

5.6.1 Propriedades Físicas

a) Características

O biossurfatante recuperado impuro apresentou uma coloração marrom avermelhada com odor rascante além de formar grumos sólidos após secagem a temperatura ambiente em dessecador. O extrato de biossurfatante purificado apresentou uma coloração marrom intensa, podendo indicar maior concentração de pigmento insolúvel em água. Isto pode ser confirmado pela aparência acinzentada de uma amostra que foi purificada a partir de uma solução estoque de biossurfatante na concentração de 6,0g/L. Esta solução que era mantida em geladeira foi diluída até a concentração de 2,0 g/L mantida sob agitação durante 12 horas. Após este período foi feita a precipitação com álcool 95%v/v sob agitação intensa e a solução resultante foi mantida em geladeira a $\pm$ 4°C por 12 horas. Passado este tempo o precipitado formado (biossurfatante) foi centrifugado a 10000xg por 20 minutos, armazenado em placa de Petri e mantido em dessecador até estar completamente seco. A Figura 27 ilustra estas afirmações.

Abdel Mawgoud, Abouuwafa e Hassouna (2009) caracterizaram um ramnolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* a partir de óleo de soja e observaram que o liquido deste composto apresentava coloração marrom amarelada, aparência viscosa e pegajosa com odor de fruta.

Figura 27 Extratos de biossurfatante secos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 a partir de glicerol.

b) Concentração Micelar Crítica

A concentração micelar crítica (CMC) é um dos parâmetros mais importantes a serem avaliados em um tensoativo, como ponto de ebulição e fusão em sustâncias puras. Ela pode ser determinada pela variação das propriedades físicas como a tensão superficial e é onde moléculas de surfatante se associam dinamicamente no seio do líquido para formar micelas que são agregados de dimensões colidais, pois há um acúmulo na superfície. A importância deste parâmetro está no fato de que a partir da CMC a tensão medida permanece constante (MANIASSO, 2001).

Através da Figura 28 notou-se a diminuição da tensão superficial da água de cerca de 70 mN/m para 35 mN/m. O valor da CMC foi 4,0g/L para o biossurfatante impuro. Em concentrações superiores a CMC o tensoativo excedente tende a formar micelas no interior da solução, as quais não modificam muito o valor da tensão superficial. Vale ressaltar que não foi feita a CMC para o biossurfatante purificado, pois cerca de 30% da amostra de biossurfatante impuro gerava este no seu estado purificado e não é interessante industrialmente o custo gerado na purificação, por isso optou-se por fazer a CMC com o biossurfatante impuro.

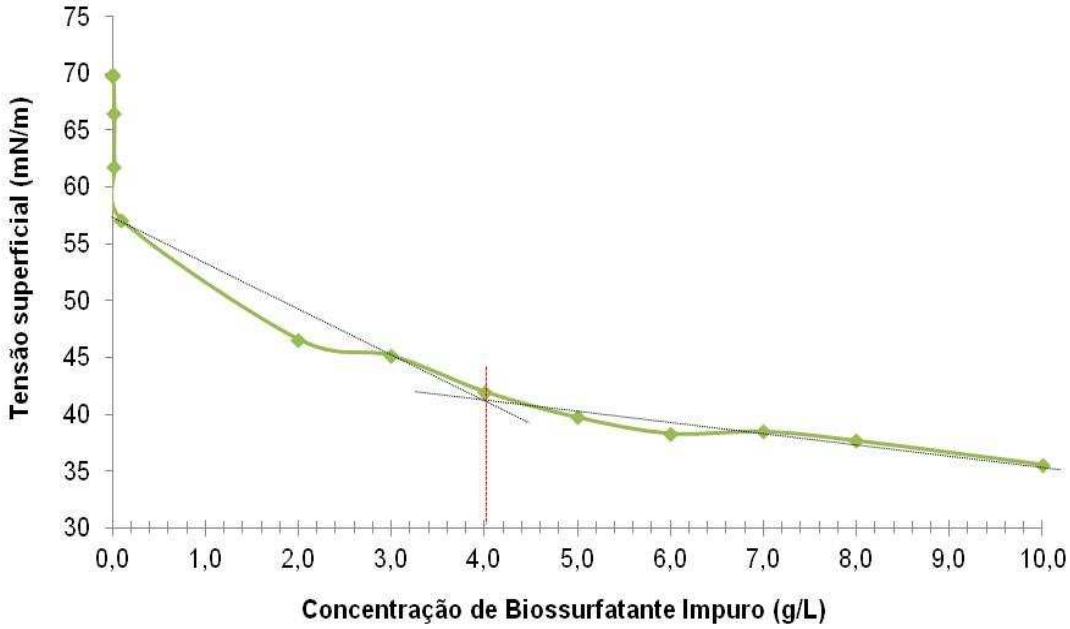


Figura 28 – Tensão superficial em função da concentração de biossurfatante impuro (pH 7,0).

c) Tolerância ao cálcio

Sabe-se que as rochas reservatório, onde o petróleo está armazenado, são compostas principalmente de areia e calcário (carbonatos de cálcio). Este teste teve o objetivo de observar o comportamento emulsificante do biossurfatante frente a diferentes concentrações de carbonato de cálcio.

A Figura 29 mostra os resultados do índice de emulsificação do querosene de aviação para soluções 4,0 g/L do biossurfatante impuro e purificado adicionadas de $CaCO_3$. Notou-se que não houve muita diferença entre o puro e o impuro nas diferentes concentrações de carbonato de cálcio e quanto maior esta concentração menor era o índice. O valor máximo alcançado foi 29% para uma solução 4,0 g/L do biossurfatante puro adicionada de 0,1 g/L de $CaCO_3$.

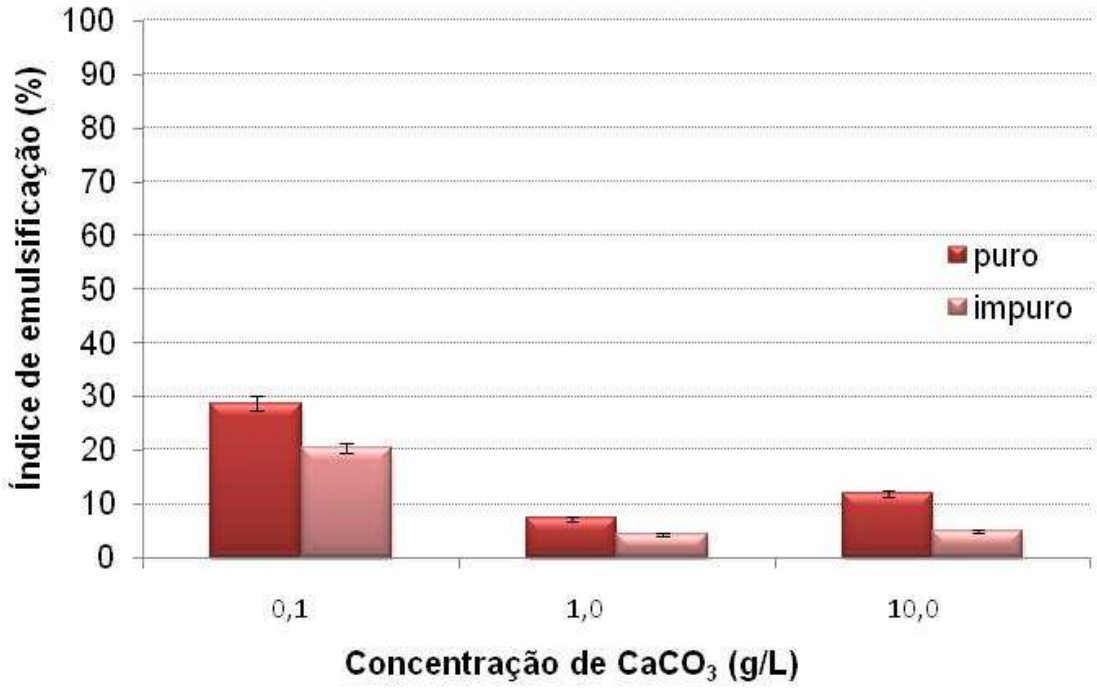


Figura 29 Efeito das concentrações de $CaCO_3$ no índice de emulsificação do querosene de aviação para soluções 4,0 g/L do biossurfatante impuro e purificado.

Para verificar a solubilidade de hexadecano residual em solo; Bai, Bruseau e Miller (1998) avaliaram o impacto de íons Na^+, Ca^{2+} e Mg^{2+} nesta propriedade. Os autores afirmaram que quando um eletrólito é adicionado a uma solução de ramnolipidio, este pode agregar-se a parte polar do surfatante reduzindo a repulsão eletrostática entre os grupos polares dos biossurfatantes. Então, a parte polar que efetivamente age em solução decresce aumentando o número de micelas e o volume dentro delas. Como resultado a solubilização de um solvente apolar na micela ou vesícula é aumentado. Estes efeitos foram observados, pois os autores utilizaram concentrações muito baixas de cálcio na forma de cloreto na faixa de 0,05 mM a 0,8 mM. Neste experimento a faixa foi de 1mM (0,1 g/L) a 100 mM (10 g/L), mesmo porque as concentrações de cálcio em rochas reservatório são elevadas.

d) Resistência a autoclavagem

A Figura 30 mostrou que não há variação significante na atividade emulsificante do querosene de aviação das soluções 4,0 g/L do biossurfatante impuro e puro quando estas foram expostas a uma temperatura de 121±1°C a 1atm por 20 minutos.

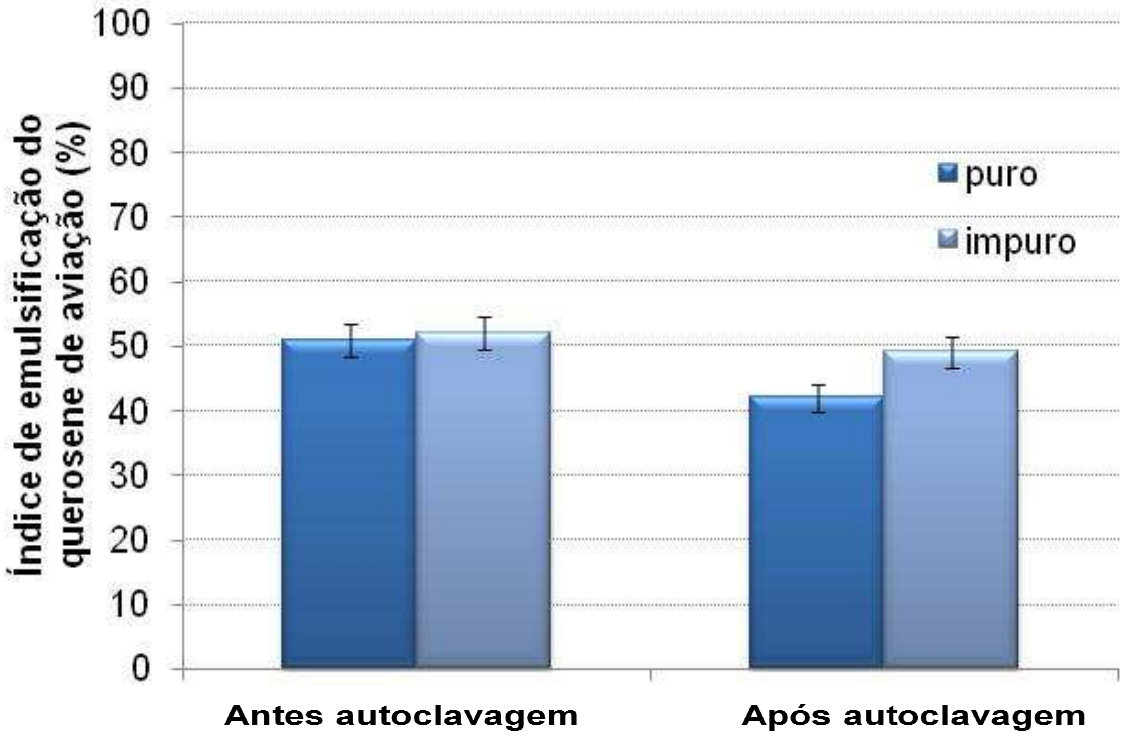


Figura 30 Efeito da autoclavagem no índice de emulsificação do querosene de aviação para soluções 4,0 g/L do biossurfatante impuro e purificado.

e) Índice de emulsificação de diferentes matérias-primas

Através das Figuras 31 e 32 notou-se que as variações importantes foram verificadas para o biodiesel e hexano. Para o óleo cru somente foi observada emulsificação com a solução do biossurfatante em seu estado puro sem a possibilidade de quantificar o índice.

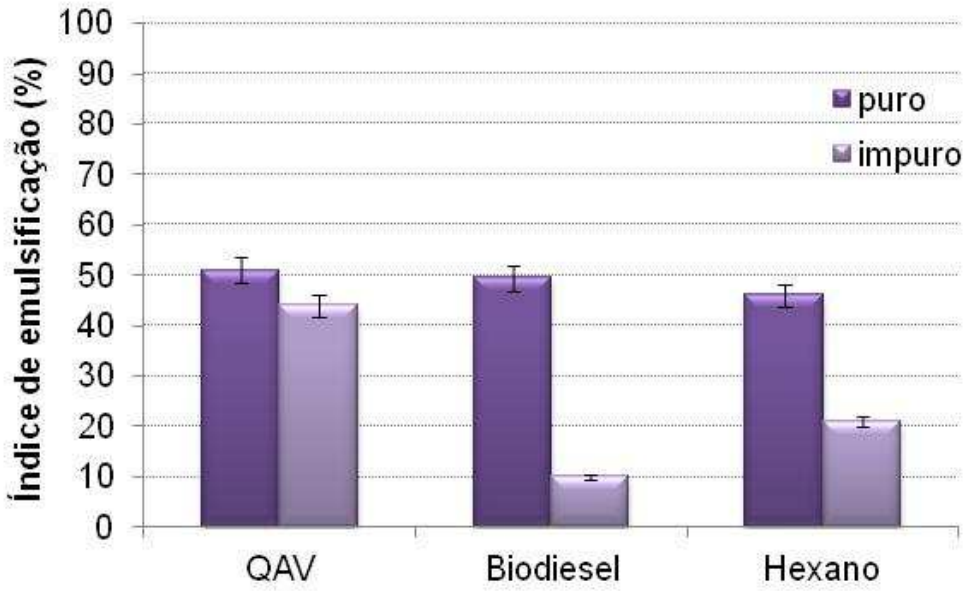


Figura 31 - Índice de emulsificação do querosene de aviação (QAV), biodiesel e hexano para soluções 4,0 g/L do biossurfatante impuro e purificado.

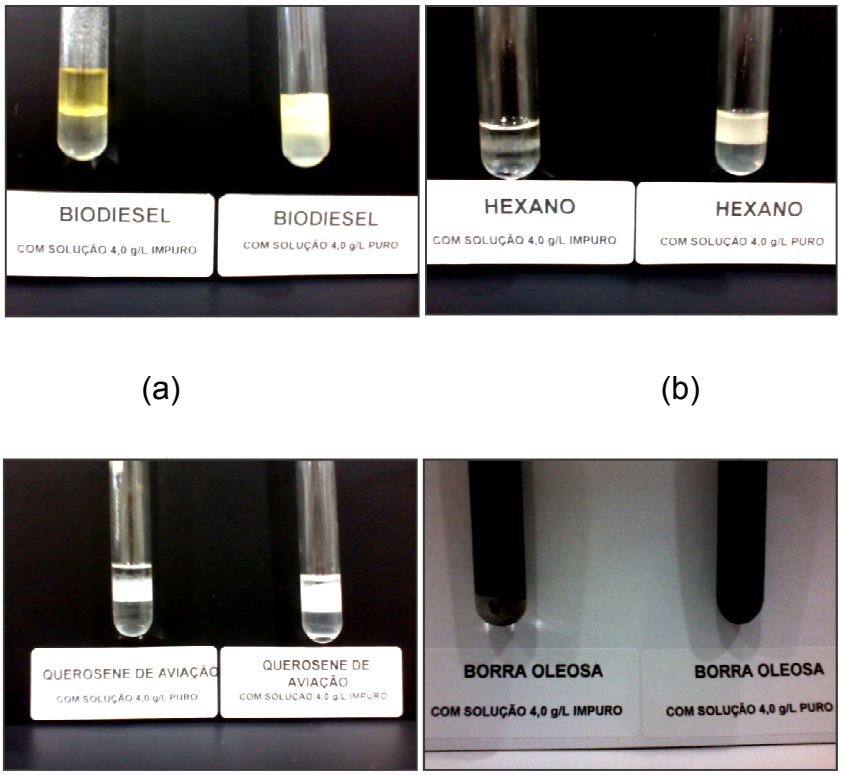


Figura 32 - Emulsificação do: (a) biodiesel; (b) hexano; (c) querosene de aviação e (d) borra oleosa para soluções 4,0 g/L do biossurfatante impuro e purificado.

f) Estabilidade em diferentes temperaturas e salinidades

Para avaliar a resposta do índice de emulsificação do querosene de aviação para os parâmetros temperatura foi feita uma análise estatística utilizando o software *Design Expert 8.0.6*. com um planejamento fatorial 2^2 em duplicata e três pontos centrais. Os valores médios das respostas estão descritos na TABELA 14.

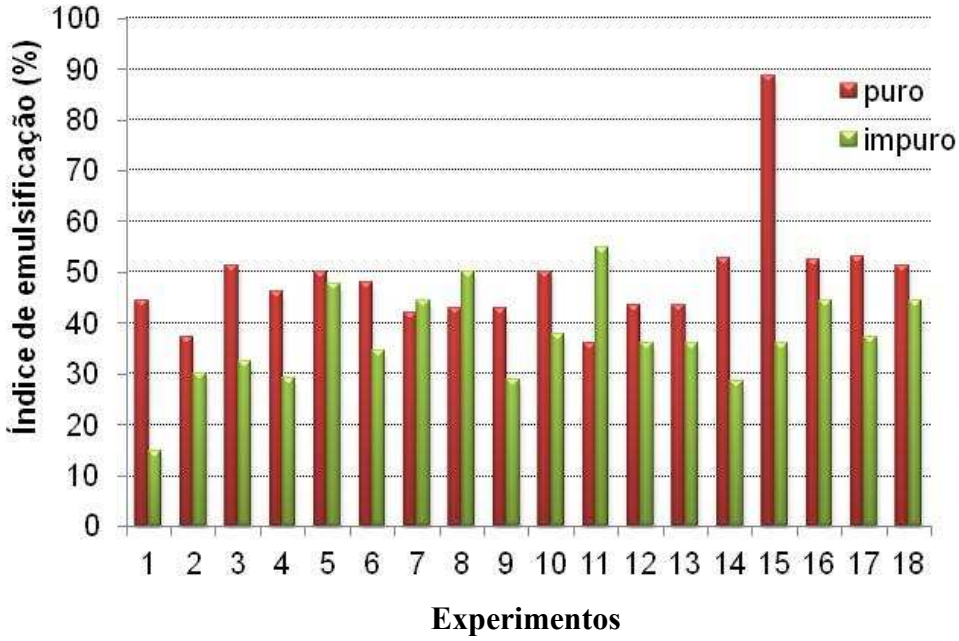
TABELA 14 Matriz do planejamento fatorial 2^2 com três pontos centrais

Experimentos (sol. 4,0 g/L)	**Salinidade (% NaCl) A**	**Temperatura (°C) B**	**IE (%) (sol. 4,0 g/L) Puro**	**IE (%) (sol. 4,0 g/L) Impuro**
1	3,5	50	44	15
2	3,5	50	37	30
3	5,5	50	51	33
4	5,5	50	46	29
5	3,5	100	50	48
6	3,5	100	48	35
7	5,5	100	42	44
8	5,5	100	43	50
9	4,5	75	43	29
10	4,5	75	50	38
11	4,5	75	36	55
12	0 (Controle)	100	43	36
13	0 (Controle)	50	43	36
14	0 (Controle)	75	53	29
15	3,5 (Controle)	Tamb	89	36
16	4,5 (Controle)	Tamb	53	45
17	5,5 (Controle)	Tamb	53	37
18	0 (Controle)	Tamb	51	44
19	BRANCO água	Tamb	-	-

TABELA 14 Matriz do planejamento fatorial 2^2 com três pontos centrais - continuação

Experimentos (sol. 4,0 g/L)	Salinidade (% NaCl) A	Temperatura (°C) B	IE (%) (sol. 4,0 g/L) Puro	IE (%) (sol. 4,0 g/L) Impuro
20	BRANCO 3,5	Tamb	-	-
21	BRANCO 4,5	Tamb	-	-
22	BRANCO 5,5	Tamb	-	-

A Figura 33 mostra, de uma maneira geral, onde os valores máximos de índice de emulsificação em diferentes salinidade. Percebe-se que os maiores valores do índice de emulsificação foram para a solução do biossurfatante puro para o Experimento 15: Controle A: 3,5; B:Tamb ($IE_{máx.}$= 89%).



Experimentos: **1:** A:3,5 (-1); B:50(-1); **2**: 3,5 (-1); B:50(-1); **3**: A: 5,5(+1); B:50(-1); **4**: A: 5,5(+1); B:50(-1); **5**: A:3,5 (-1); B:100(+1); **6**: A:3,5 (-1); B:100(+1). **7**: A:5,5 (+1); B:100(+1). **8**: A:5,5 (+1); B:100(+1). **9:** A: 4,5(0); B:75. **10:** A: 4,5(0); B:75. **11:** A: 4,5(0); B:75. **12:** Controle A: 0; B:100. **13:** Controle A: 0; B: 75. **14:** Controle A: 0; B: 50. **15:** Controle A: 3,5; B:Tamb. **16:** Controle A: 4,5; B: Tamb. **17:** Controle A: 5,5; B:Tamb. **18:** Controle A: 0; B:Tamb; onde A:[NaCl] em %m/v; B: temperatura em °C e Tamb: temperatura ambiente: 28±2°C.

Figura 33 Experimentos para o estudo do efeito da salinidade e temperatura no índice de emulsificação do querosene de aviação.
dos Santos, F. P. B/ Novembro 2011

O programa *Design Expert 8.0.1.0,* sugere que um modelo de dois fatores com interação (2FI) é o melhor ajuste para o índice de emulsificação tanto para solução 4,0g/L de biossurfatante impuro como para o purificado.

O modelo nada mais é que uma equação que relaciona a resposta com as variáveis de entrada controladas, sendo estabelecido como resíduo a diferença entre o valor experimental e o valor ajustado pelo modelo, o qual é dado pela Equação 8:

$$Y=\beta_0+\beta_1 A+\beta_2 B+\beta_{12} AB+\varepsilon \quad (8)$$

Sendo Y a resposta, β_0 o efeito médio global, A (salinidade) e B (temperatura) as variáveis de entrada controladas, β_1 e β_2 os efeitos dos níveis, β_{12} o efeito da interação e ε um componente de erro.

f.1) Solução de Biossurfatante Impuro

Através da análise de variância (ANOVA) para o modelo do índice de emulsificação do querosene de aviação para a solução do biossurfatante impuro verificou-se que este não era significativo sendo necessário ajustes. Vale ressaltar que mesmo que não haja significância no modelo isto não quer dizer que o fenômeno não possa ser descrito, porém optou-se por ajustar manualmente o modelo verificando quais as melhores alternativas para que o valor de p fosse menor que 0,005. Devido a isto, foi necessária a aplicação de uma transformação (ln) e a retirada interação para que o modelo representasse melhor o fenômeno. O modelo codificado proposto está descrito na Equação 9:

$$\text{Ln}\ (IE_{impuro})=+3{,}56 +0{,}13A +0{,}27B \quad (9)$$

A TABELA 15 mostra a análise de variância para esta resposta. Os valores de F são comparados a valores tabelados a 95% de confiança. Se o valor de F é maior que o tabelado a hipótese de não haver influência (nula) é rejeitada, ou seja, o fator afeta significativamente o índice de emulsificação. Os valores de p inferiores a 0,05 indicam que há significância, mostrando que o modelo é válido.

O modelo adotado pode ser avaliado através do gráfico de probabilidade normal dos resíduos conforme mostrado na Figura 36, sendo que os valores próximos a reta indicam a validade do modelo proposto.

O quadrado do coeficiente de correlação (R^2) indica que apenas 54,2% da variabilidade dos dados se ajustaram ao modelo.

TABELA 15 ANOVA para o índice de emulsificação do querosene de aviação para uma solução 4,0 g/L do biossurfatante impuro.

Fator	SQ	GL	MQ	*F*	P
Modelo	0,71	2	0,35	4,75	0,0048
A	0,13	1	0,13	1,76	0,2218
B	0,58	1	0,58	7,73	0,0239
Resíduo	0,60	8	0,075		
Falta de ajuste	0,084	2	0,042	0,49	0,6333
Erro	0,51	6	0,086		
Total	1,31	10			

A: salinidade; B: temperatura; SQ: soma dos quadrados, GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática

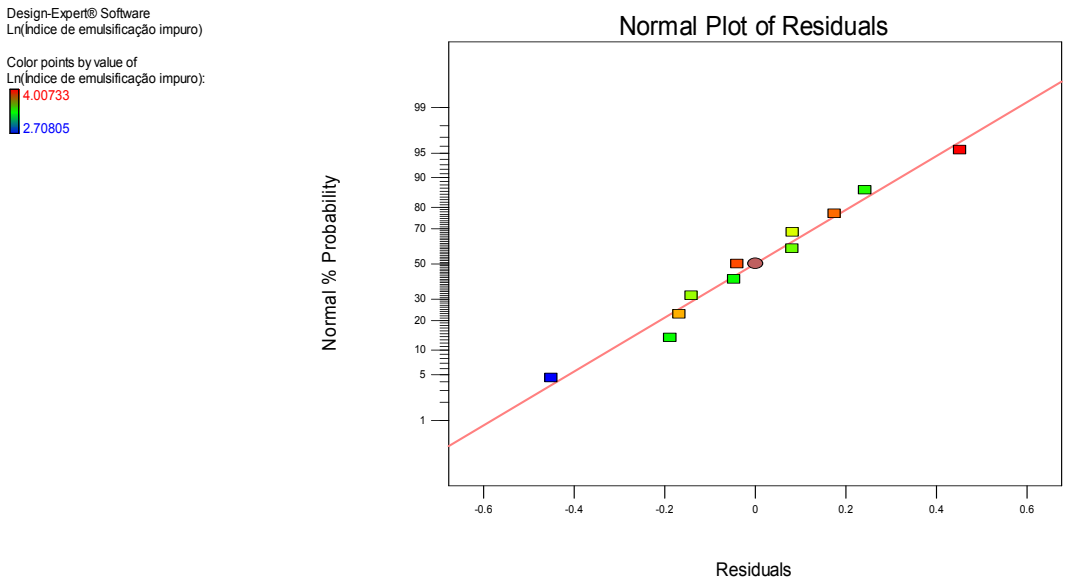


Figura 34 Probabilidade normal dos resíduos para o modelo do índice de emulsificação do querosene de aviação para solução do biossurfatante impuro.

f.2) Solução de Biossurfatante Puro

Da mesma forma que o item anterior foi feita uma análise de variância (ANOVA) para o índice de emulsificação do querosene de aviação de uma solução 4,0 g/L do biossurfatante puro, porém o modelo mesmo com ajustes não foi significativo em nível de 95% de confiança.

Os testes estatísticos indicaram que o biossurfatante não sofre variações significativas em sua estabilidade.

5.6.2 Análises Instrumentais

a) Análise Espectrométrica no Infra-Vermelho com Transformada de Fourrier (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIV) é uma importante técnica de caracterização de materiais, sendo muito utilizada na identificação da natureza química de vários tipos de materiais.

Esta é uma metodologia que detecta similaridades ou diferenças nas estruturas químicas dos compostos. Pode ser usada para a quantificação dos biossurfatantes, pois a grande maioria possui um radical carbonila, ligação éster ou ácido carboxílico, os quais absorvem energia na região infravermelha do espectro eletromagnético (BATISTA, 2002, GARTSHORE; LIM; COOPER, 2000).

Os espectros FTIR do biossurfatante puro e impuro foi comparado espectros aos obtidos para a goma xantana comercial (FARIA *et al*, 2011) além da comparação com a literatura (LOVAGLIO *et al*, 2011; FREITAS *et al*, 2009; PORSUNTHORNTAWEE *et al*, 2008). As duas áreas preliminares para serem examinadas em um espectro são as regiões de 4000 a 1300 cm^{-1} e de 900 a 650 cm^{-1} onde estão situadas as absorções de grupamentos funcionais importantes (Figura 35).

O espectro do extrato de biossurfatante purificado (Figura 37b) mostrou importantes bandas de absorção entre 4000-400 cm^{-1}: 3335,0: banda de estiramento larga do grupamento O-H de ácidos carboxílicos; 2964,5: estiramento assimétrico e simétrico de CH_2 ou de CH_3; 1655,3: estiramento de grupamentos carbonila C=O característica de polissacarídeos (SINGH *et al*, 2011); 1538,9 e 1409,2: vibrações de

estiramento dos grupos carbonila –COO-H; 1263,0: estiramento simétrico de grupos carbonila; 1096,23 e 1024: vibração de deformação de grupos carbonila de éster; 865,4, 798,6 e 700,3 são características de ligações glicosídicas. Estas bandas sugerem a presença de ramnolipídeos no extrato de biossurfatante.

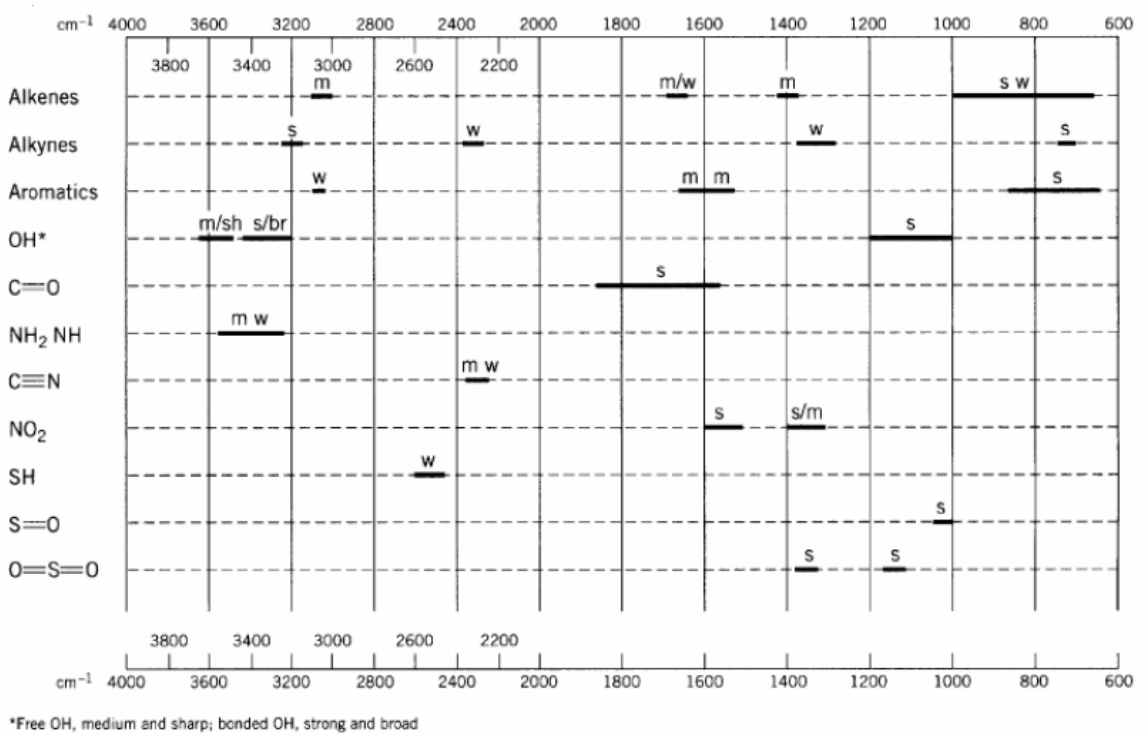


Figura 35 Carta simplificada das frequências dos grupos funcionais mais comuns

Bharali e Konwar (2011) obtiveram um espectro semelhante para um ramnolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* utilizando meio mineral adicionado de hexadecano como fonte de carbono. Os autores afirmam que picos em 2927,03; 2860,39; 1725 e 1300 a 1100 cm^{-1} são importantes bandas características de um tipo de biossurfatante glicolipídico. Outras bandas e picos importantes em 3430,19 cm^{-1}, estiramento de OH^-; picos de adsorção forte em 3000-2700 cm^{-1}, alongamento de hidrocarbonetos alifáticos –CH; picos característicos para grupos éster em 1725,32 cm^{-1}, vibrações de estiramento para grupos carbonila -C=O; pico forte em 1638,1 cm^{-1}, vibrações de alongamento dos grupos carbonila -COO-; picos de absorção entre 1300 e 1.000 cm^{-1}, vibração de deformação de grupos carbonila de éster (Figura 36).

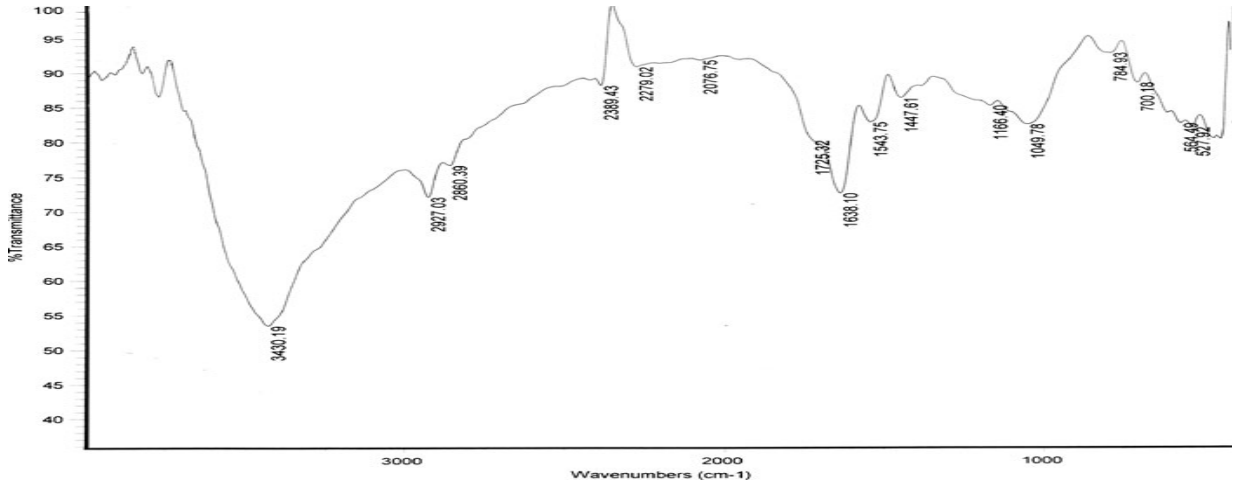
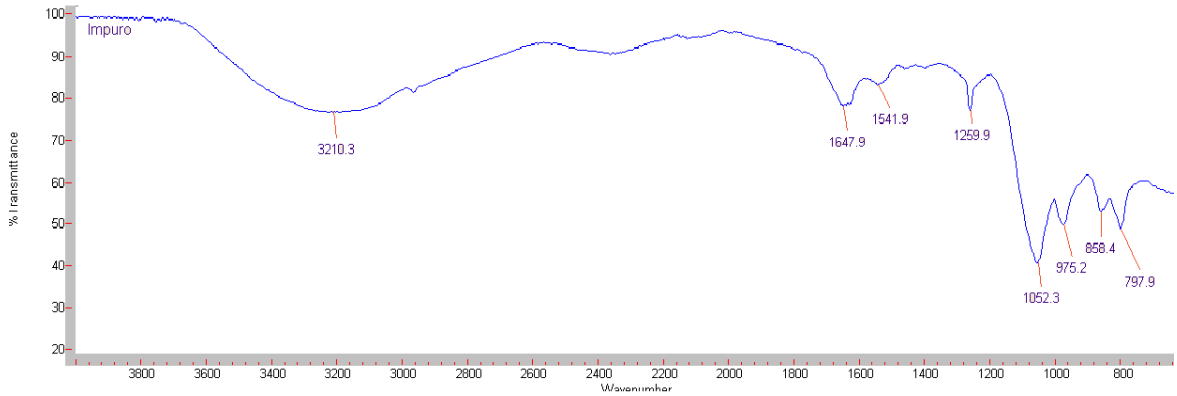
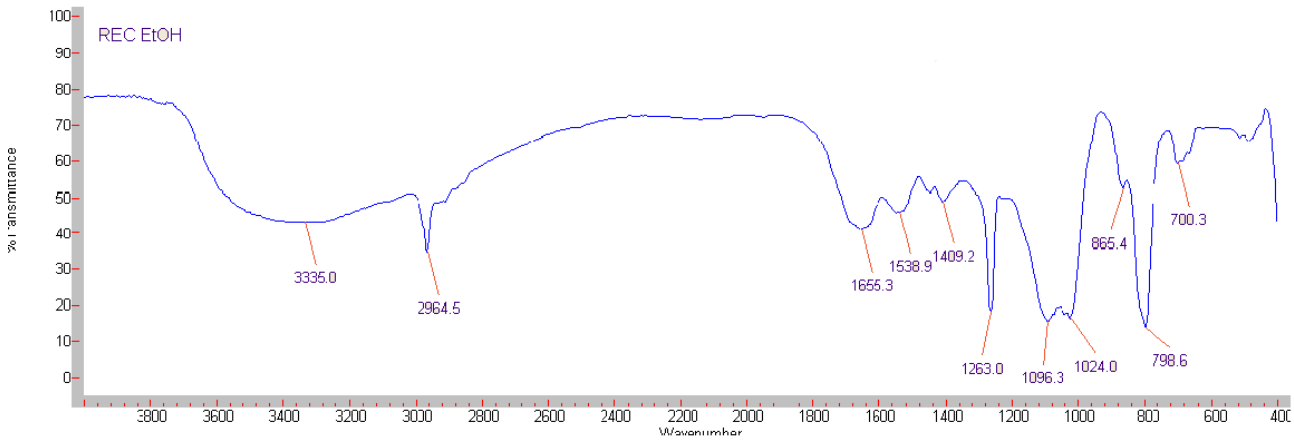


Figura 36 Espectros FT-IR de ramnolipídeos por Barali e Konwar (2011).



(a)



(b)

Figura 37 - Espectros FTIR de amostras do extrato de biossurfatante impuro (a) e puro (b) em pastilhas de KBr.

dos Santos, F. P. B/ Novembro 2011

b) Análise Termogravimétrica (TG)

A análise termogravimétrica se baseia no estudo da variação de massa de uma amostra resultante de uma transformação (física sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação, decomposição, oxidação) em função da temperatura. É um processo contínuo que envolve a medida da variação de massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo a uma temperatura constante. Como resultado é possível caracterizar o perfil de degradação de polímeros e muitos outros materiais. O equipamento de termogravimetria é basicamente constituído por uma microbalança, um forno, um programador de temperatura e um sistema de aquisição de dados (MOTHÉ e AZEVEDO, 2009; LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

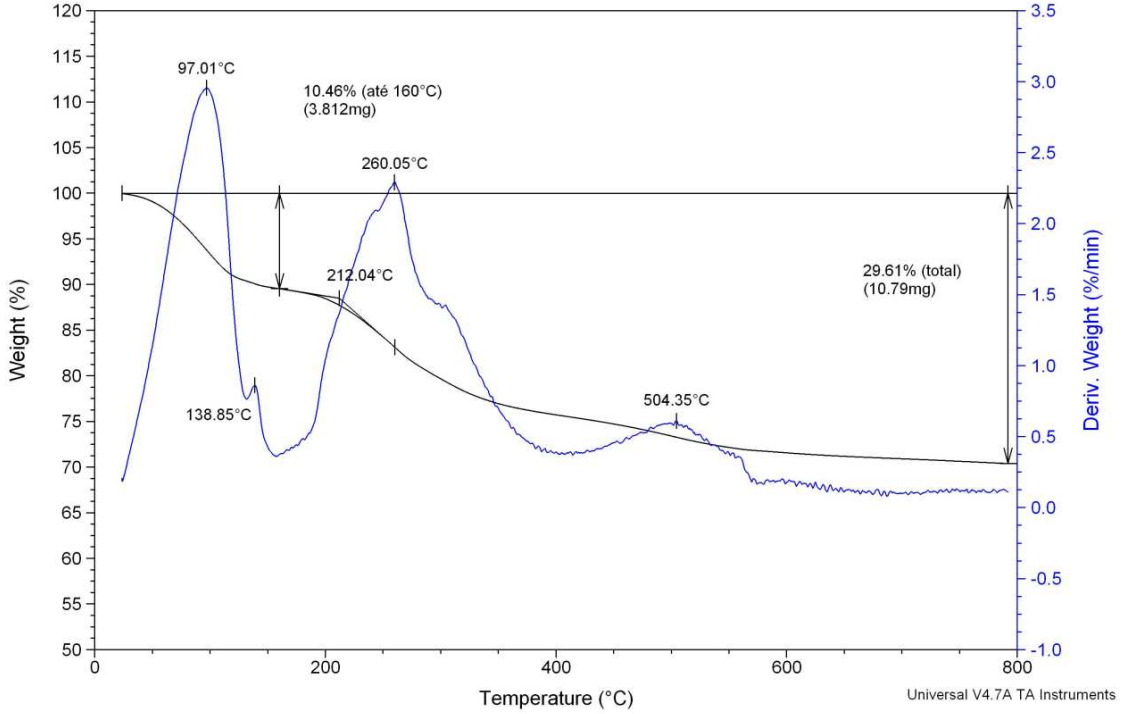
A termogravimetria derivada DTG indica as temperaturas correspondentes ao início e ao instante em que a velocidade de reação é máxima e auxiliam na visualização de curvas termogravimétricas (IONASHIRO, 2004).

A Figura 38 mostra as curvas termogravimétricas (TG) além das curvas termogravimétricas derivadas (DTG), das amostras do extrato de biossurfatante impuro (a), purificado (b) e uma terceira amostra purificada utilizando na precipitação etanol 95%v/v a uma temperatura de $4 \pm 1^{o}C$ (c).

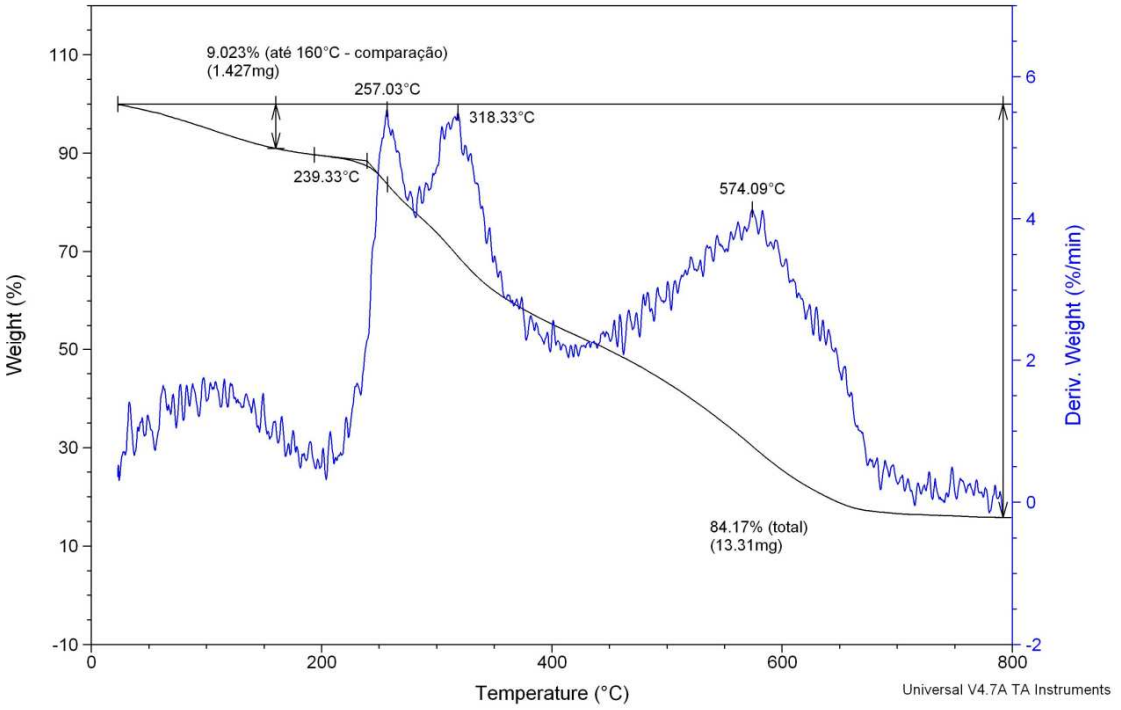
Observou-se um padrão diferenciado na curva termogravimétrica do extrato de biossurfatante impuro (Figura 38a) quando comparadas as curvas termogravimétricas dos extratos purificados, principalmente no que diz respeito ao o resíduo formado a $800^{o}C$, que sugere uma grande quantidade de material inorgânico (cerca de 70%). A purificação utilizando precipitação etanol à temperatura ambiente (Figura 38b) mostrou-se eficaz já que o resíduo final foi cerca de 15%. Para o purificado utilizando etanol resfriado na precipitação esse resíduo foi de 9% (Figura 38c).

A umidade não se mostrou diferente para as três curvas, cerca de 10%. A temperatura inicial de decomposição não variou para os extratos puros ($239,33^{o}C$ para curva *b* e $237,30^{o}C$ para curva *c*), porém isso não aconteceu quando comparadas ao extrato impuro ($212,04^{o}C$). Sabe-se que a temperatura inicial indica

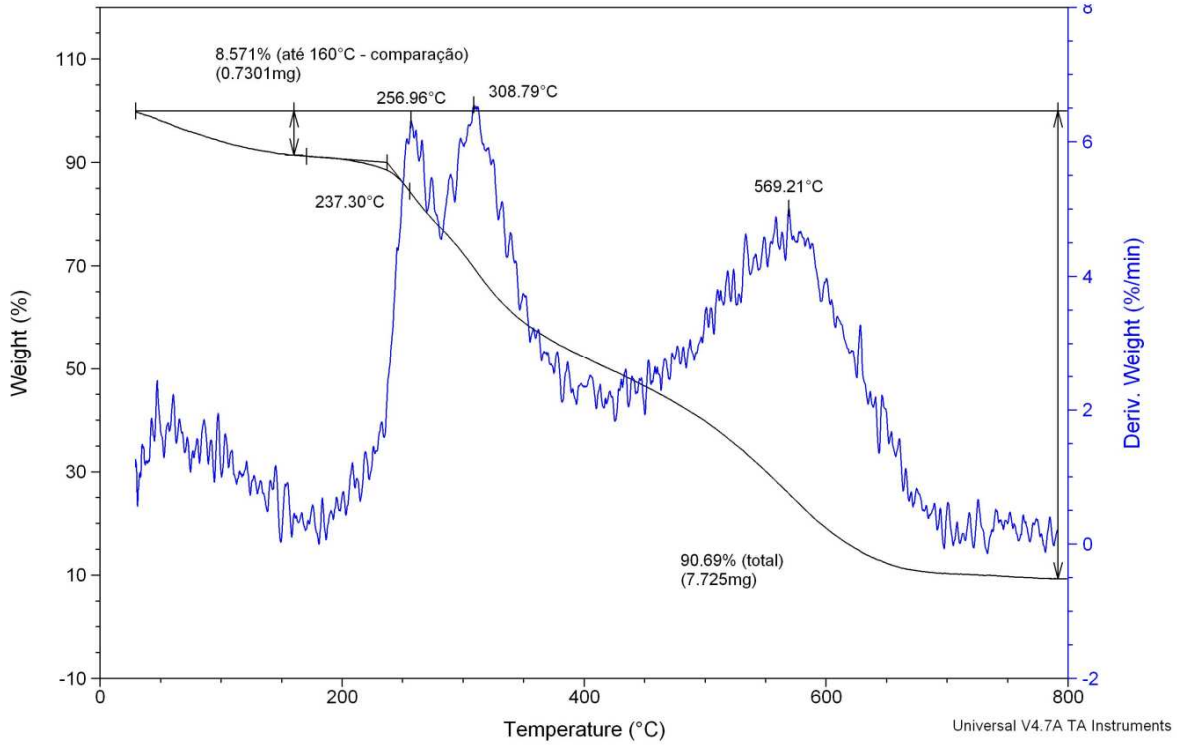
a estabilidade térmica de um determinado composto. Quanto mais elevada esta temperatura menor será a degradação (de ALMEIDA e MOTHÉ, 2009).



(a)



(b)



(c)

Figura 38 – Curvas termogravimétricas do extrato de biossurfatante impuro (a); purificado (b) e purificado com etanol a 4ºC±1ºC.

c) Análise Reológica

A reologia, no caso de fluidos, estuda o comportamento e as propriedades do escoamento devido à ação de uma força por unidade de área em planos hipotéticos de líquido, chamada tensão de cisalhamento τ. A viscosidade η é a resistência ao escoamento e é, matematicamente, a derivada do gráfico da tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento γ, medida do gradiente de velocidade entre os planos (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

Pode-se dizer como exemplo, que durante o escoamento de um fluido em um tubo as moléculas colidem entre si e quanto mais próximas das paredes menor é a velocidade de escoamento aumentando em direção ao centro do líquido. Quando esta velocidade é praticamente igual diz-se que o fluido tem comportamento newtoniano e a derivada do gráfico é 0.

A Figura 39 mostrou o comportamento de uma solução 4,0 g/L do biossurfatante impuro e outra 4,0 g/L do biossurfatante purificado. Notou-se que os fluidos comportam-se como fluidos newtonianos, com viscosidade muito baixa na ordem de 10^{-3} Pa.s.

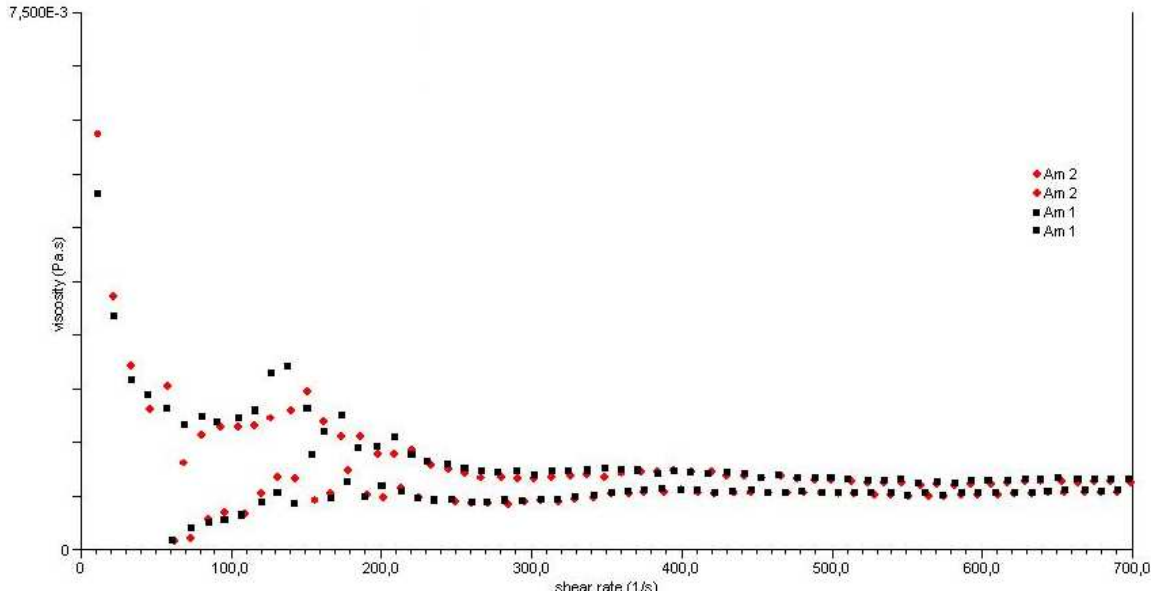
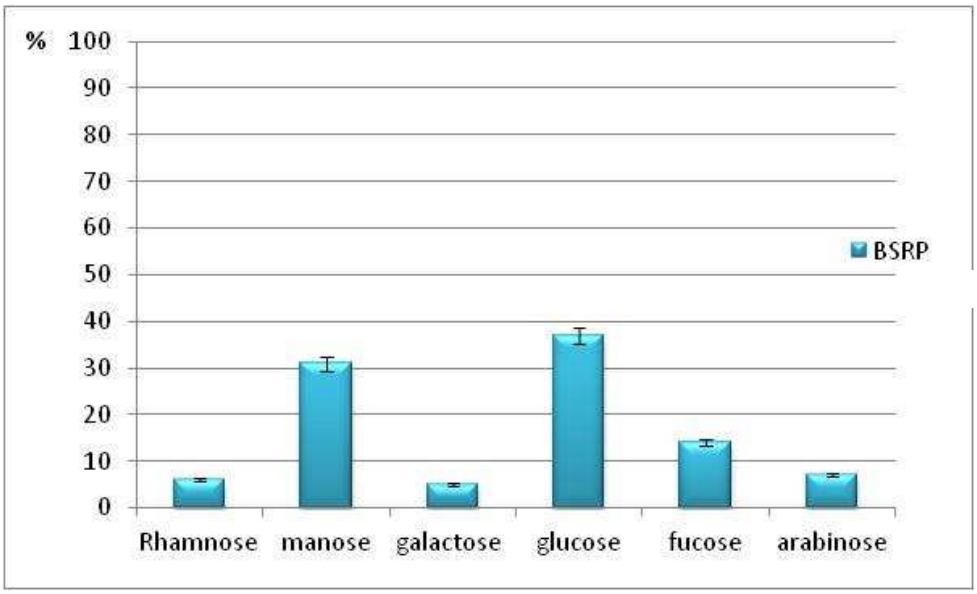


Figura 39 Curvas de viscosidade para solução 4,0g/L de biossurfatante impuro (Am 2) e solução 4,0 g/L de biossurfatante purificado (Am 1). 30°C.

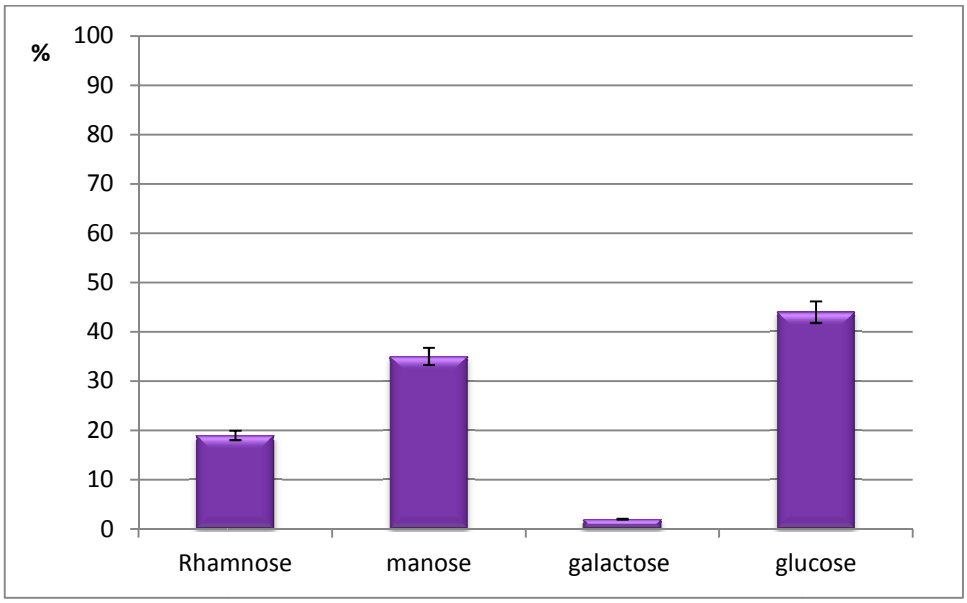
5.6.3 Determinação da composição monossacaridica

A análise de açúcares foi uma das ferramentas principais para a confirmação da produção do ramnolipídeo. Freitas *et al* (2008) encontraram quatro principais constituintes de um exopolissacarídeo produzido por *Pseudomonas oleovorans* a partir de glicerol: 70% em mol do conteúdo principal de carboidratos era galactose, 23% manose, 3% glicose e 4% ramnose.

A Figura 40 mostra as porcentagem de açúcares na amostra.



(a)



(b)

Figura 40 Análise de açúcares para o biossurfatante recuperado purificado de solução estoque 6,0 g/L (a) e para o biossurfatante recuperado purificado (b)

Observou-se pelos gráficos da figura 40 que o biossurfatante recuperado de solução estoque apresentou uma quantidade maior de açúcares na análise. Isto pode ser devido ao fato da degradação de algum açúcar.

CAPÍTULO 6

Conclusões e Sugestões

6.1 Conclusões

A metodologia do planejamento de experimentos pôde demonstrar a necessidade da verificação da interação dos parâmetros para a obtenção de uma melhor resposta, o que minimiza o tempo de análise e melhora as condições para um experimento de maior porte, como a utilização de um fermentador. Os modelos puderam, a 95% de confiança, explicar as variações dos dados.

1) O comportamento das variáveis independentes para a obtenção de uma melhor resposta pode ser resumido em:

   - Para o aumento do índice de emulsificação do querosene de aviação, a concentração inicial de biomassa e a concentração inicial de glicerol foram as que mais influenciaram no aumento deste índice em pH 7,0. IE%máximo=75%;

   - Para o aumento do consumo de glicerol a interação entre os parâmetros estudados não foi influente, porém verificou-se a importância da concentração inicial de biomassa e da concentração inicial de glicerol, em pH 7,0. CG%máximo=43%.

   - A diminuição da tensão superficial foi a resposta que obteve o melhor coeficiente de correlação para o modelo proposto. As variáveis de influência foram a concentração inicial de biomassa e a concentração inicial de glicerol, em pH=7,0. DT%máximo=44%;

   - O crescimento celular não apresentou um modelo significante, porém é influenciado pelo pH e pela concentração inicial de biomassa, com uma concentração inicial de glicerol de 40g/L. XF máximo g/L=4,56g/L.

2) Obteve-se um bom rendimento para o ensaio em fermentador na fase II de 0,68 g de produto/g de substrato;

3) O processo de fermentação ocorreu em pouco tempo, 72 horas, utilizando meio mineral e glicerol sem alimentação adicional, gerando significativamente um baixo custo ao processo;

4) O biossurfatante não sofreu alterações expressivas quando exposto a diferentes temperaturas e salinidades confirmadas pela análise estatística dos dados, tanto o extrato puro quanto o impuro;

5) A técnica de termogravimetria mostrou que o processo de purificação foi eficiente;

6) O conjunto de análises instrumentais com a análise de açúcares sugere a formação de um ramnolipídeo.

6.2 Sugestões

1) O processo se mostrou eficiente utilizando glicerol técnico, propõe-se então, a utilização de glicerol residual proveniente da indústria de biodiesel para novos trabalhos.

2) Para uma melhor avaliação da estrutura e classificação do ramnolipídeo podem ser utilizadas outras técnicas de caracterização, como HPLC além da comparação com um padrão sintético de ramnolipídeo.

3) A produção em pequena escala gerou uma quantidade pequena de biossurfatante, tanto impuro (13,7 g/L) como o purificado (0.9 g/L). Propõe-se uma produção em fermentadores de maior porte.

Referências

ABDEL-MAWGOUD A. M.; HAUSMANN R. ; LÉPINE F. Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation and Bioengineering of Production. G. Soberón-Chávez (ed.), Biosurfactants**, Microbiology Monographs** 20, DOI 10.1007/978-3-642-14490-5_2, 2011

ABDEL-MAWGOUD A., ABOULWAFA M. M., HASSOUNA N. A-H. Characterization of Rhamnolipid Produced by Pseudomonas aeruginosa Isolate Bs20. **Applied Biochemistry Biotechnology**. v.7, p.329–345, 2009.

AL-SULAIMANI H.; AL-WAHAIBI Y.; AL-BAHRY, S.; ELSHAFIE, A.; AL-BEMANI A.; JOSHI, S. Experimental Investigation of Biosurfactants Produced by Bacillus Species and Their Potencial for MEOR in Omani Oil Field. **Society of Petroleum Engineers**, SPE 129228, 2010.

ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, S.; NABIA, A.. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens.* **Desalination**. n.223, p.143–151, 2008.

ABREU F.R.; LIMA, D.G.; HAMÚA, C.W.; SUAREZ, P.A.Z. Utilization of metal complexes as catalysts in the transesterification of Brazilian vegetable oils with different alcohols. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v.209 p. 29–33, 2004.

ALISKE, M. A.; ZAGONEL G. F.; COSTA B. J.; VEIGA, W.; SAUL, C. K. Measurement of biodiesel concentration in a diesel oil mixture. **Fuel**, n.86, p.1461–1464, 2007.

ATADASHI, I. M.; AROUA, M.K.; AZIZ, A.A.. High quality biodiesel and its diesel engine application: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** . v.14, n.7, p. 1999-2008, 2010.

ANTCZAK, M.S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy.** n. 34, p.1185–1194, 2009.

BAI G.; BRUSEAU M.L.;MILLER R.M. Influence of Cation Type, Ionic Strength, and pH on Solubilization and Mobilization of Residual Hydrocarbon by a Biosurfactant **Journal of Contaminant Hydrology**. v.30, p. 265-279, 1998.

BATISTA, Selma Baia. **Bactérias de Ambientes Contaminados com Petróleo ou Derivados Produtoras de Surfactantes e Emulsificantes**. Viçosa. 2002, BATISTA, Viçosa: UFV, 2002, 44p.Tese de mestrado – Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. Minas Gerais,2002

BARBOSA, M. M. C.; PAZ, M. C. de F. Produção de Biossrfactantes por *Chromobacterium Violaceum* Utilizando como Substrato Óleo Vegetal (Óleo de pequi). In: **II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica**,João Pessoa, Paraíba, Brasil, 2007. II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, 2007.

BANAT, I. M. Biosurfactants Production and Possible Uses in Microbial Enhaced Oil Recovery and Oil Pollution Remediation: A Review. **Bioresource Technology.** v. 51, p. 1-12, 1995.

BAO M.; KONG, X.; JIANG, G. WANG, X.; LI, X. Laboratory study on activating indigenous microorganisms to enhance oil recovery in Shengli Oilfield **Journal of Petroleum Science and Engineering**. v. 66, p. 42–46, 2009.

BASHA, S. A.; GOPAL, K. R.; JEBARAJ, S. A review on biodiesel production, combustion, emissions and performance. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n.13, p. 628–1634, 2009.

BANSAL K.; MCCRADY J.; HANSEN A.; BHALERAO K. Thin Layer Chromatography And Image Analysis To Detect Glycerol In Biodiesel.**Fuel**. v.87, p. 3369–3372, 2008.

BEHZADI, Sam e FARID, M. M. Production of biodiesel using a continuous gas–liquid reactor. **Bioresource Technology**. n.100, p. 683–689, 2009.

BHARALI P.; KONWAR , B. K. Production and Physico-Chemical Characterization of a Biosurfactant Produced by *Pseudomonas aeruginosa* OBP1 Isolated from

Petroleum Sludge. **Applied Biochemistry Biotechnology**. v. 164, p.1444–1460, 2011.

BOGNOLO, G.. Biosurfactants as Emulsifying Agents for Hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A, Physicochemical and Engineering Aspects**, n. 152, p. 41-52, 1999.

BONET, J.; COSTA, J.; SIRE, R.; RENEAUME, J-M.; PLESU, A. E.; PLESU, V.; BOZGA G. Revalorization of glycerol: Comestible oil from biodiesel synthesis**. Food and Bioproducts Processing**. v. 87, p. 171–178, 2009.

BOURNAY,L.; CASANAVE D; DELFORT, B.; HILLION, G.; CHODORGE, J.A.New heterogeneous process for biodiesel production: A way to improve the quality and the value of the crude glycerin produced by biodiesel plants. **Catalysis Today**.n.106, p.190-192, 2005.

BRASIL. Lei 11.097, de 13 de setembro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nos 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 14 jan. 2005. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/2698.html>. Acesso em 09/03/2009

BRYANT, R. S.; BURCHFLELD, T. E. Review of Microbial Technology for Improving Oil Recovery. **SPE Reservoir Engineering**. p. 151-154, May,1989;

CALADO, V. e MONTGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o *Statistica.*** Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, 2003. 257p.

CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G.A.; UAD, I.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. **Science of the Total Environment**, n. 7, p. 3634 – 3640, 2009.

CAMEOTRA, S. e SINGH, P. Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, n. 62, p. 274–280, 2008.

CAMILIOS, D. Neto ; MEIRA, J. A.; de ARAÚJO, J. M.; MITCHELL, D. A.; KRIEG, N. Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture. **Applied Microbiology Biotechnology**, n.81, p.441–448, 2008.

CANILHA, L.; SILVA, D. D. V.; CARVALHO, W.; MANCILHA, I. M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa parte 3: Polissacarídeos e Enzimas. **Revista Analytica**, n.20, Dezembro 2005/Janeiro 2006.

CÁRDENAS, D. P.; PULIDO, C.; ARAGÓN, Ó. L.; ARISTIZÁBAL, F. A.; SUÁREZ, Z. R.; MONTOYA, D. Evaluación de la producción de 1,3-propanodiol por cepas nativas de *Clostridium sp.* mediante fermentación a partir de glicerol USP y glicerol industrial subproducto de la producción de biodiesel. **Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.** v. 35, n.1, p. 120-137, 2007.

CARMO, A. C. Jr.; de SOUZA, L. K.C.; da COSTA, C. E. F. ; LONGO, E; ZAMIAN, J. R.; da ROCHA G. N. Filho. Production of biodiesel by esterification of palmitic acid over mesoporous aluminosilicate Al-MCM-41. **Fuel,** n.88, p.461–468, 2009.

CAVALHEIRO, J. M.B.T.; de ALMEIDA, M. C. M. D.; GRANDFILS, C.; da FONSECA M. M. R. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. **Process Biochemistry**. n.44, p.509–515, 2009.

CÉSAR, A da S.; BATALHA Biodiesel production from castor oil in Brazil: A difficult reality. **Energy Policy**. v.38, p. 4031–4039, 2010.

CHA, M.; LEE ;N.; KIM, M.; KIM, M.; LEE, S.. Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida* **Bioresource Technology** , n.99, p.2192–2199, 2008.

CHATZIFRAGKOU, A.; MAKRI, A.; BELKA, A.; BELLOU, STAMATINA; MAVROU, M.; MASTORIDOU,M.; MYSTRIOTI, P.; ONJARO, G.; AGGELIS, G.; PAPANIKOLAOU, S.. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. **Energy.** v. 36, p. 1097-1108 , 2011.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, n.25, p.294–306, 2007.

CHONGKHONG, S.; TONGURAI, C.; CHETPATTANANONDH, P. Continuous esterification for biodiesel production from palm fatty acid distillate using economical process. **Renewable Energy**. n. 34, p.1059–1063, 2009.

COOPER, D.G. E GOLDENBERG, B.G. Surface-Active Agents from Two Bacilllus Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53., p. 224-229, 1987.

_____, D.G.; ZAJIC, J. E.; GERSON; F. Production of Surface-Active Agents Two *Bacillus* Species. **Applied and Environmental Microbiology.** n.1, v.37, p. 4-10,1979.

COKS, L. V. & VAN REDE, C. (1966). In: Laboratory handbook for oils and fats analysis, 1st ed., Academy Press, London

CORONADO, C. R.; DE CARVALHO JR., J.A.; YOSHIOKA, J. T.; SILVEIRA, J. L. Determination of ecological efficiency in internal combustion engines: The use of biodiesel. **Applied Thermal Engineering**. v.29 p. 1887–1892, 2009

COSTA, S.G.V.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** .n.41, p. 483–488, 2006.

_____, S. G. V. A. O., LÉPINE, F.; MILOT, S.; DÉZIEL, E.; NITSCHKE, M.; · CONTIERO, Jonas. Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa.* **Jounal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v.26, p. 1063-1072, 2009.

COLLA, L. M. e COSTA, J.A.V. Obtenção e aplicação de biossurfatantes. **Vetor**. n.13, p. 85-103, 2003.

CURBELO, Fabíola Dias da Silva. **Recuperação Avançada de Petróleo Utilizando Tensoativos**. Natal. 2006. CURBELO, Natal: UFRN, 2006, 190p. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. Rio Grande do Norte, 2006.

DALTIN, 2011.*Tensoativos: Química, propriedades e aplicações*, 1ª ed., SP: Blucher, São Paulo, 2011.

DAGBERT, C.; MEYLHEU, T.; BELLON-FONTAINE, Marie-Noëlle. Pit formation on stainless steel surfaces pre-treated with biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens.* **Electrochimica Acta**, n.54., p.35–40, 2008.

DARVISHI, P.; AYATOLLAHI, S.; MOWLA, D.; NIAZI, A. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPPI-2.**Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.84, p. 292–300, 2011.

DAS P.; MUKHERJEE S.; SEN R.. Biosurfactant of marine origin exhibiting heavy metal remediation properties.**Bioresource Technology**, n.100, p.4887–4890, 2009.

da SILVA, G. P; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**. n.27, p. 30–39, 2009.

de ALMEIDA, C.C.; MOTHÉ, C.G. Avaliação de Compósitos Odontológicos por Análise Térmica e Microscopia Eletrônica de Varredura. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 1, p. 85-93, 2009.

de ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L.B.; FELIPE, M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica** Nº26. Dezembro 2006/Janeiro 2007

DEMIRBAS, Ayhan. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy Conversion and Management** . n. 50, p. 14–34, 2009.

DESAI, J. E BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potencial. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.61, n.1, p. 47-64, 1997.

de SOUSA, J. S., CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D'AVILA; ARANDA, D. A. G.; FREIRE, D. M. G. Application of lipase from the physic nut (Jatropha curcas L.) to a new hybrid enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.65, p.133–137, 2010.

de SOUZA, G. R.; DOS SANTOS, A. M.; FERREIRA, S. L.; MARTINS, K. C. R.; MÓDOLO, D. L. Evaluation of the performance of biodiesel from waste vegetable oil in a flame tube furnace. **Applied Thermal Engineering**. v.29 p. 2562–2566, 2009.

del RÍO, P. e BURGUILLO, M. An empirical analysis of the impact of renewable energy deployment on local sustainability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V.13 , p.1314–1325, 2009.

DI SERIO M.; TESSER R.; DIMICCOLI M.; CAMMAROTA F.; NASTASI M. ; SANTACESARIA E. Synthesis of biodiesel via homogeneous Lewis acid catalyst. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical** . n.239, p. 111–115, 2005.

DIZGE, N.; AYDINER, C.; IMER, D.Y.; BAYRAMOGLU, M.; TANRISEVEN, A.; KESKINLER B. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. **Bioresource Technology.** n.100, p.1983–1991, 2009.

DOVI, V. G.; FRIEDLER, F.; HUISINGH, D.; KLEMES, J. J. Cleaner energy for sustainable future. **Journal of Cleaner Production**, n.17, p.889–895, 2009.

EASTERLING, E. R.; FRENCH, W. T.; HERNANDEZ, R.; LICHA, M. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of Rhodotorula glutinis. **Bioresource Technology**. n.100, p. 356–361, 2009.

EEVERA, T.; RAJENDRAN K.; SARADHA S. Biodiesel production process optimization and characterization to assess the suitability of the product for varied environmental conditions. **Renewable Energy** . n.34, p. 762–765, 2009.

EFTEKHART, A. A.; BRUINING, J.; WAHANIK, H.; MARCHESIN, D. CO2 Injection in Sub-Salt Water Layers at 7000m Depth. **Society of Petroleum Engineers**. SPE 142191, 2011.

ESCOBAR , J. C.; LORA, E. S.; VENTURINI, O. J.; YANEZ, E. E.; CASTILLO, E. F; ALMAZAN, O. Biofuels: Environment, technology and food security. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n.13, p.1275–1287, 2009.

FARIA, S.;PETKOWICZ, C. L. DE O; DE MORAIS, S. A. L.; TERRONES, M. G. H.; RESENDE, M. M.; DE FRANÇA, F. P; CARDOSO, V. L. Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth. **Carbohydrate Polymers**. V.86, n. 2, 469-476, 2011.

FANG, X.; WANG, Q.; BAI, B.; LIU, X. C.; TANG, Y.; SHULER, P. J.; GODDARD III, W. Engineering Rhamnolipid Biosurfactants as Agents for Microbial Enhaced Oil Recovery. **Society of Petroleum Engineers**. SPE 106048, 2007.

FONSECA, R. R.; SILVA J. R.; de FRANÇA, F. P.; CARDOSO, V. L.; SÉRVULO, E. F. C. Optimizing Carbon/Nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtillis* strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 136-140, p.471–486, 2007.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; CARVALHEIRA, M.; COSTA, N.; OLIVEIRA, R.; REIS, M. A. M. Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. **Carbohydrate Polymers**, n.78, p.549–556, 2009a.

_____, F. ALVES, V. D.; PAIS, J.; COSTA, N.; OLIVEIRA, C.; MAFRA, L.; HILLIOU, L.; OLIVEIRA, R.; REIS, M.A.M. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. **Bioresource Technology, n. 100, p.** 859–865, 2009b.

_____, F.; ALVES, V. D.; PAIS, J.; COSTA, N.; CARVALHEIRA, M.; OLIVEIRA, R.; REIS, M. A. M. Biopolymers Production by Microbial Fermentation on Glycerol-Rich Product. In: **Proceedings of the 10th International Chemical and Biological Engineering Conference – CHEMPOR,** Braga, Portugal, 2008. Proceedings of the 10th International Chemical and Biological Engineering Conference - CHEMPOR , 2008.

GARCEZ, C. A. G.; VIANNA, J. N. de S. Brazilian Biodiesel Policy: Social and environmental considerations of sustainability. **Energy.** n.34, p.645–654, 2009.

GARCIA, S. Evento analisa mudanças no mercado com novo percentual de biodiesel no diesel. **Canal Rural,** São Paulo, 01 de set. de 2009. Disponível em <http://www.clicrbs.com.br/canalrural/jsp/default.jsp?uf=1&local=1&action=noticias&id=2638511&section=noticias>Acesso em: 10 set. 2009

GARTSHORE, J.; LIM, Y.C.; COOPER, D.G. Quantitative Analysis of Biosurfactants Using Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectrocopy. **Biotechnology Letters**. V.22, p. 169–172, 2000.

GHARAEI-FATHABAD, E. Biosurfactants in Pharmaceutical Industry: A Mini-Review. **American Journal of Drug Discovery and Development**. v.1 , n.1, p. 58-69, 2011

GLICERINA-Sub-produto do biodiesel. **Biodieselbr.com.** Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/biodiesel/glicerina/biodiesel-glicerina.htm> Acesso em: 03 jun. 2008.

GOMES, M. C. S; PEREIRA, N. C. P; de BARROS, S. T. D. Separation of biodiesel and glycerol using ceramic membranes, **Journal of Membrane Science**. v.352, p. 271–276, 2010.

GRISHCHENKOV, V. G.; TOWNSEND, R. T.; MCDONALD, T. J.; AUTENRIETH, R. L.; BONNER, J. S.; BORONIN, A. M. Degradation of Petroleum Hydrocarbons by Facultative Anaerobic Bacteria Under Aerobic and Anaerobic Conditions, **Process Biochemistry**, n. 35, p. 889-896, 2000.

HABA, E.; VIDAL-MAS, J.; BASSAS,M.; ESPUNY,M.J.; LLORENS, J.; MANRESA, A. Poly 3-(hydroxyalkanoates) produced from oily substrates by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCBIM 40044): Effect of nutrients and incubation temperature on polymer composition. **Biochemical Engineering Journal**. n.35, p. 99–106, 2007.

HÁJEK, M. e SKOPAL, F. Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production. **Bioresource Technology** . v.101 p. 3242–3245, 2010.

HAN , M; YI, W., WU, Q.; LIU, Y.; HONG, Y; WANG, D. Preparation of biodiesel from waste oils catalyzed by a Brønsted acidic ionic liquid. **Bioresource Technology**. v.100 , p. 2308–2310, 2009.

HAMA, S.; TAMALAMPUDIA, S.; YOSHIDA, A.; TAMADANIA, N.;KURATANIC, N.; NODA, H.; FUKUDAD, A. K. Enzymatic packed-bed reactor integrated with glycerol-separating system for solvent-free production of biodiesel fuel. **Biochemical Engineering Journal**. v.55, p. 66–71, 2011.

HEALY, M.G.; DEVINE, C.M. e MURPHY, R. Microbial Production of biosurfactants. **Resources, Conservation and Recycling.** n.18, p. 41-57, 1996.

HILLIOU, L.; FREITAS, F.; OLIVEIRA, R.; REIS, M. A. M.; LESPINEUX, D.; GRANDFILS, C.; ALVES, V. D.. Solution properties of an exopolysaccharide from a Pseudomonas strain obtained using glycerol as sole carbon source. **Carbohydrate Polymers**, n.78, p.526–532, 2009.

http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/2698.html)

http://www1.folha.uol.com.br/ambiente/876379-mistura-de-biodiesel-no-diesel-convencional-pode-aumentar.shtml

http://sustentabilidade.allianz.com.br/?203/Perfil-da-bioenergia-preservando-a-natureza).

http://www.biodieselbr.com/biodiesel/glicerina/biodiesel-glicerina.htm

HUNG, Chin-Chang; SANTSCHI, P. H.; GILLOW, J. B. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides produced by *Pseudomonas fluorescens* Biovar II. **Carbohydrate Polymers**, n.61, p.141–147, 2005.

JANAUN, J e ELLIS, N. Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.14, p.1312–1320, 2010

IMANDI, S. B.; VENKATA, V.; BANDARU, R.; SOMALANKA, S. R; GARAPATI H. R. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design .**Enzyme and Microbial Technology** n.40, p.1367–1372, 2007.

IONASHIRO,M. 2004.*Fundamentos da Termogravimetria , Análise Térmica Diferencial, Calorimetria Exploratória Diferencial.* 1ª ed, SP: Giz Editorial, Araraquara, 2004.

JOSEPH, P.J. E JOSEPH, A. Microbial enhanced separation of oil from a petroleum refinery sludge. **Journal of Hazardous Materials**, n.161, 522–525, 2009.

JOSHI, S.; YADAV, S.; DESAI, A. J.. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum medium components for the enhanced production of lichenysin by *Bacillus licheniformis* R2. **Biochemical Engineering Journal**, n.41,p.122–127, 2008.

KACZORECK, E. e OLSZANOWSKI, A. Uptake of Hydrocarbon by *Pseudomonas fluorescens* (P1) and *Pseudomonas putida* (K1) Strains in the Presence of Surfactants: A Cell Surface Modification. **Water Air Soil Pollution** v. 214, p.451–459., 2011.

KAUR, M e ALI, A. Lithium Ion Impregnated Calcium Oxide As Nano Catalyst For The Biodieselproduction From Karanja And Jatropha Oils **Renewable Energy.** v.36. p. 2866-2871

KEGL, B. Effects of biodiesel on emissions of a bus diesel engine. **Bioresource Technology**, n. 99, p.863–873, 2007.

KESKIN, A., GURU, M.; ALTIPARMAK, D. Biodiesel production from tall oil with synthesized Mn and Ni based additives: Effects of the additives on fuel consumption and emissions. **Fuel.** n.86 , p. 1139–1143, 2007.

KJÄRSTAD, J. e JOHNSSON, F. Resources and futures supply of oil. **Energy Policy** n.37, p.441–464, 2009.

KNOTHE, G; GERPEN, J. Van; KRAHL, J.; RAMOS. *Manual de Biodiesel***.** SP: Blucher, São Paulo, 2006.

LAPINSKIENĖ, A.; MARTINKUS, P.; RĖBˇDAITĖ, V. Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil**. Environmental Pollution.** n.142, p. 432-437, 2006.

LAI, C-C; YIN, C. H.; WEI, Y-H; CHANG, J-S Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. **Journal ofHazard. Materials. Journal of Hazardous Materials.** v.167, p. 609-614, 2009.

LEAL, Márcia C. M. R. **Tratamento sequencial enzimático-anaeróbio aplicado aos efluentes das indústrias de laticínios**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2004. Tese de

Doutorado em Engenharia Química – Programa de Engenharia Química/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K.H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**. v.87, p. 1083–1095, 2010

LI , H; SHEN, B.; KABALU, J.C.; NCHARE, M. Enhancing the production of biofuels from cottonseed oil by fixed-fluidized bed catalytic cracking. **Renewable Energy**. v.34, p.1033–1039., 2009.

LIMA, P.C.R. *Pré-Sal - O Novo Marco Legal e a Capitalização da Petrobras*, 1ª ed., RJ: Editora Synergia: Rio de Janeiro, 2011.

LOTFABAD, T. B.; SHOURIAN , M.; ROOSTAAZAD, R.; NAJAFABADI, A. R. An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01,isolated from oil excavation areas in south of Iran. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, n.69 p.183–193, 2009.

R.B. LOVAGLIO et al., Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** (2011), doi:10.1016/j.colsurfb.2011.03.001

LUCAS, N.; BIENAIME, C.; BELLOY, C; QUENEDEUC, m.; SILVESTRE, F. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques. **Chemosphere** . v.73, p. 429–442, 2008.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E.E.C. *Caracterização de Polímeros: Determinação do Peso Molecular e Análise Térmica*. RJ: e-Papers. Rio de Janeiro, 2001.

LUCION, A P. S; SIEDEMBERGER, D. R.; MARASCA, E.N.; TEIXEIRA, U.M. Desenvolvimento Sustentável: O desafio da sociedade contemporânea. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n. 36, 2006.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, n.70, p.1-15,1999.

MADIGAN, M., MARTINKO, J. E PARKER, J. Microbiologia de Brock : Pearson Education do Brasil Editora. 2004. 608 p.

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

MANIASSO, N. Ambientes Micelares em Química Analítica. **Quimica Nova***,* v.24, n. 1, p. 87-93, 2001.

MARCHETTI, J.M; MIGUEL, V.U.; ERRAZU, A.F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n.11, p. 1300-1311, 2007.

MARQUÉS A.M.; PINAZO A.; FARFANA M.; ARANDAC F.J.; TERUEL J.A.; ORTIZ A., MANRESA A., ESPUNY M.J..The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7. **Chemistry and Physics of Lipids**,n.158, p.110–117, 2009.

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

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. *Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros.* RJ: LTC, Rio de Janeiro, 2003.

MORITA,T; KONISHI, M.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Production of Glycolipid Biosurfactants, Mannosylerythritol Lipids, by *Pseudozyma siamensis* CBS 9960 and Their Interfacial Properties. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**. v. 105, n. 5, p. 493–502, 2008.

MORITA, T.; KONISHI,M.; FUKUOKA,T.; IMURA,T. ; KITAMOTO, D. Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a

basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317*T* Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 104, n.1, p. 78–81, 2007.

MORÓN-VILLARREYES, J.A.; SOLDI, C.; de AMORIM, A.M.; PIZZOLATTI, M.G.; de MENDONÇA Jr. , A.P.; D'OCA, M.G.M. Diesel/biodiesel proportion for by-compression ignition engines. **Fuel** (2007), doi:10.1016/j.fuel.2007.01.003.

MOTA, C. J. A.; da SILVA, C.X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**. v.32, n.3, p. 639-648, 2009.

MOTHÉ, C. H e de AZEVEDO, A. D. *Análise Térmica Materiais***.** 1ª Ed. SP: Artliber Editora. São Paulo, 2005

MULLIGAN, C.N. Environmental aplications for biosurfactants. n.133, p. 183-198, 2005.

MULUGETTA, Y. Evaluating the economics of biodiesel in Africa Renewable and Sustainable. **Energy Reviews**, n.13, p.1592–1598, 2009.

MUÑOZ, M.; MORENO, F.; MONNÉ, C.; MOREA, J.; TERRADILLOS, J. Biodiesel improves lubricity of new low sulphur diesel fuels . **Renewable Energy**. v.36, p.2918-2924, 2011.

NABI, Md. N.; RAHMAN Md. M.; AKHTER, Md. S.. Biodiesel from cotton seed oil and its effect on engine performance and exhaust emissions **Applied Thermal Engineering**. n.29, p.2265–2270, 2009.

NAJAFI, G; GHOBADIAN, B.; TAVAKOLI, T.; YUSAF, T. Potential of bioethanol production from agricultural wastes in Iran. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v.13, p. 1418–1427, 2009.

NAIR, L.S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**. v. 32 p. 762–798, 2007.

NAWAWI, W. M. F. W.; JAMAL, P.; ALAN, Md. Z. Utilization of sludge palm oil as a novel substrate for biosurfactant production. **Bioresource Technology** . v.101, p. 9241–9247, 2010.

NIKIEMA, J. E HEITZ,M. Le biodiesel II. Production- une synthèse. **Rev Can. Génie. Civ**.n.35, p.107-117, 2008.

NITSKE, M e PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Quimica. Nova***,* v. 25, n.5, p.772-776, 2002.

_____, COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. Trends in **Food Science & Technology**.v. 18, p. 252-259, 2007.

OLIVERA,N. L.; NIEVAS, M. L.; LOZADA, M., del PRADO, G.; DIONISI, H. M.; FAUSTINO, S. Isolation and characterization of biosurfactant-producing *Alcanivorax* strains: hydrocarbon accession strategies and alkane hydroxylase gene analysis. **Research in Microbiology. v.** 160, p.19-26, 2009.

OLIVEIRA F.J.S.; VAZQUEZ L.; de CAMPOS N.P.; de FRANÇA F.P. Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain. **Process Biochemistry**, n.44, p.383–389, 2009.

ÖNER, C. e ALTUN, S. Biodiesel production from inedible animal tallow and an experimental investigation of its use as alternative fuel in a direct injection diesel engine. **Applied Energy**, n.86, p.2114–2120, 2009.

OZDEMIR,G ; PEKER, S; HELVACI, S. S. Effect of pH on the surface and interfacial behavior of rhamnolipids R1 and R2. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v.26, p. 135-143, 2004.

PACHECO, F. Biodiesel: Será o combustível do futuro? **Conjuntura e Planejamento**. Salvador: SEI, n.122, p.26-31, Julho/2004.

PATIL, P. D. e DENG, S. Optimization of biodiesel production from edible and non-edible vegetable oils. **Fuel** . v.88, p. 1302–1306, 2009.

PONTON, J. Biofuels: Thermodynamic sense and nonsense. Journal **of Cleaner Production** . n.17, p. 896–899, 2009.

PORNSUNTHORNTAWEE O.; MAKSUNG S.; HUAYYAI,O.; RUJIRAVANIT R.; CHAVADEJ S. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using

sequencing batch reactors: Effects of oil loading rate and cycle time. **Bioresource Technology**, n.100, p.812–818, 2009.

_____; ARTTAWEEPORNA, N.; PAISANJIT, S.; SOMBOONTHANATE, P.; ABEB, M.; RUJIRAVANIT, R.; CHAVADEJA, S. Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery. **Biochemical Engineering Journal** . n.42 p. 172–179, 2008.

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**. n. 71, p. 1781–1785, 2008.

QIUZHUO Z.; WEIMIN C.; JUAN W. Stimulatory effects of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* BSZ-07 on rice straw decomposing. **Journal of Environmental Sciences**. n.20, p. 975–980, 2008.

RECKSIDLER, R.; VOLPON, A. G. T.; BARBOSA, L. C. F; BRASILEIRO, C.G; NICOLAU, H. C. C.; de CALASANS Jr, J. A. M. A Microbial Enhaced Oil Recovery Field Pilot in a Brazilian Onshore Oilfield. **Society of Petroleum Engineers**. SPE 129930, 2010.

REHMAN, A; PHALKE, D. R.; PANDEY, R. Alternative fuel for gas turbine: Esterified jatropha oilediesel blend. **Renewable Energy** . v.36.p. 2635-2640, 2011.

RESOLUÇÃO ANP Nº 7, DE 19.3.2008 - DOU 20.3.2008i 11.097. Disponível em: < http://www.ellopuma.com.br/pdf/resolucao_anp_n7_de_19.3.2008_dou20.3.2008.pdf > Acesso em 20/05/2009

RINAUDO M.Role of Substituents on the Properties of Some Polysaccharides **Biomacromolecules**, n.5, p.1155-1165, 2004.

RíO, P.D. e BURGILLO, M. An empirical analysis of the impact of renewable energy deployment on local sustainability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews. V.** 13 p. 1314–1325, 2009

RIVALDI, J.D ; SARROUH, B. F. ; FIORILO, R ; SILVA, S. S. . Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 37, p. 44-51, 2008.

ROBLES-MEDINA, A.; GONZÁLEZ-MORENO, P.A.; ESTEBAN-CERDÁN, L.; MOLINA-GRIMA, E. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production **Biotechnology Advances**. n 27, p. 398–408, 2009

RODRIGUES. L.; BANAT, I. M.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R.Biosurfactants: potential applications in medicine**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v.9, 2006.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F.; *Planejamento de experimentos e otimização de processos:uma estratégia seqüencial de planejamentos*, 1ª ed., SP: Casa do Pão Editora: Campinas 2005.

ROONEY A. P.; PRICE N. P. J.; RAY K. J; KUO Tsung-Min. Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. **FEMS Microbiology Letters**, n.295, p.82–87, 2009.

SABOURIN-PROVOST G. e HALLENBECK P. C. High yield conversion of a crude glycerol fraction from biodiesel production to hydrogen by photofermentation **Bioresource Technology** . n.100, p. 3513–3517, 2009.

SÁNCHEZ, E. A.; D'ANGELO, M. A.; COMELLI, R. A. Hydrogen production from glycerol on Ni/Al2O3 catalyst. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 35, p. 5902 – 5907, 2010.

SALEH, J; TREMBLAY, A. Y;DUBÉ, M. A. Glycerol removal from biodiesel using membrane separation technology. **Fuel**. V. 89, p. 2260–2266, 2010.

SAMIR, M.; ELA, M. A. El; MARSAFY, S. EL; TAYEB, S. El; WALY, A.A.; SAYYOUH. New Incubated *Pseudomonas aeruginosa* Bacteria for Increasing Oil Recovery under Reservoir Conditions,. **Society of Petroleum Engineers**. SPE 126104, 2010

SANTA ANNA L.M.; SEBASTIAN, G.V.;.MENEZES, E.P; ALVES, T.L.M.; SANTOS, A.S.; PEREIRA, N.Jr.; .FREIRE, D.M.G Production of biosurfactants from

Pseudomonas aeruginosa PA1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 19, n. 02, p. 159 - 166, 2002.

SELEMBO, P. A.; PEREZ, J.M.; LLOYD, W. A.; LOGAN, B. E.; High hydrogen production from glycerol or glucose by electrohydrogenesis using microbial electrolysis cells. **International Journal of Hydrogen Energy**, n.34, p.5373 – 5381, 2009.

SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. **Progress in Energy and Combustion Science.** n. 34 , p. 714– 724, 2008.

SHAVANDI, M.; GHASEMALI, M.; HADDADI,A.; SHAKARAMI,H.; NUHI, A. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium Rhodococcus sp. strain TA6. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.82, p. 477–482, 2011.

SHIBASAKI-KITAKAWA, N; HONDA, H.; KURIBAYASHI, H.; TODA, T.; FUKUMURA, T.; YONEMOTO, T. Biodiesel production using anionic ion-exchange resin as heterogeneous catalyst. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 416–421, 2007.

SILVA, S.N.R.L.; FARIAS, C.B.B.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. v.79, p. 174–183, 2010.

SINGH, A.; VAN HAMME, J.D., WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, n.25, p. 99–121, 2007.

SINGH, R. P.; SHUKLA, M. K.; MISHRA, A.; KUMARI,P.; REDDY, C.R.K; JHA, B. Isolation and characterization of exopolysaccharides from seaweed associated bacteria *Bacillus licheniformis*. **Carbohydrate Polymers**. v.84, p. 1019–1026, 2011

SIRIWARDHANA, M.; OPATHELLA G.K.C.; JHA , M.K. Bio-diesel: Initiatives, potential and prospects in Thailand: A review. **Energy Policy**, n.37, p. 554–559, 2009.

SLONEKER, J. H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, vl 6, p. 20-24, 1972.

SREBOTNJAK, T e HARDI, P. Prospects for sustainable bioenergy production in selected former communist countries. **Ecological Indicators**. v.11, p. 1009–1019, 2011

SRINIVASAN, S. The food v. fuel debate: A nuanced view of incentive structures **Renewable Energy**, n.34, p.950–954, 2009.

SUTHERLAND I. W.. Microbial polysaccharides from Gram -negative bacteria **International Dairy Journal**, n.11, p.663–674, 2001.

SUAREZ, P. A. Z. ; SANTOS, A. I. F.; RODRIGUES, J.P.; ALVES, M. B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los **Quimica Nova***,* v. 32, n.3, p.768-775, 2009.

TANG, Y; MENG, M. ZHANG, J.; LU, Y. Efficient preparation of biodiesel from rapeseed oil over modified CaO. **Applied Energy**. v.88, p. 2735–2739, 2011.

THANOMSUB, B.; WATCHARACHAIPONG, T.; CHOTELERSAK, K., ARUNRATTIYAKORN, P; NITODA, T.; KANZAKI, H. Monoacylglycerols: glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast, *Candida ishiwadae.* **Journal of Applied Microbiology**. v. 96, p. 588–592, 2004.

THAVASI, R; JAYALAKSHMI, S.; BANAT, I. M. Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. **Bioresource Technology** . v.102 (2011) 3366–3372

TORRES, E.D.; CHIRINOS, H.D.; ALVES, C.T.; SANTOS, D.C; CAMELIER, L.A. Biodiesel: o combustível para o novo século. **BAHIA ANÁLISE & DADOS**. Salvador, v. 16, n.1, p. 89-95, jun. 2006.

ULMANEN,J. H; VERBONG, G. P. J.; RAVEN, R. P. J.M.. Biofuel developments in Sweden and the Netherlands Protection and socio-technical change in a long-term perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.13. p. 1406–1417, 2009.

VASCONCELLOS U. **Investigação do antagonismo entre *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias do grupo coliforme**. Recife: UFPE, 2005. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia de Bioativos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, n.24, p.604–620, 2006.

VERMA S.; BHARGAVA R.; PRUTHIB V. Oily sludge degradation by bacteria from Ankleshwar, India. **International Biodeterioration & Biodegradation**, n.57, p. 207–213, 2006.

VICENTE, G.; MARTÍNEZ, M.; ARACIL, J. Optimisation of integrated biodiesel production. Part I. A study of the biodiesel purity and yield. **Bioresource Technology**, n.98, p.1724–1733, 2007.

VIEIRA, R. B; LIMA, C. J. B ; FRANÇA, F. P.; SÉRVULO, E. F. C.; CARDOSO, V. L. Estudo da produção de Biossurfatante Empregando Culturas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e PALR. In: **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, Campinas, SP, 2005. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2005.

WEI, Yu-Hong; CHENG, Chieh-Lun; CHIEN, Chih-Ching; WAN, Hisao-Ming. Enhaced di-rhamnolipid production with a indigenous isolate *Pseudomonas aeruginosa* J16. **Process Biochemistry** . v. 43, n. 7, p. 769-774, 2008..

WHANG, Liang-Ming; LIU Pao-Wen G.; MA Chih-Chung; CHENG Sheng-Shung. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. Journal of Hazardous Materials, n.151, p.155–163, 2008.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Eds.). Methods in Carbohydrate Chemistry, New York: Academic Press, 2, 65-68. 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Eds.). Methods in Carbohydrate Chemistry, New York: Academic Press, 2, 211-215, 1963b.

WORLD ENERGY COUNCIL. **Biofuels, Policies, Standards and Technologies**.London,United Kingdom, 2010.

WU, Jane-Yii; YEH, Kuei-Ling; LU, Wei-Bin; LIN, Chung-Liang; CHANG, Jo-Shu. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. **Bioresource Technology**. n.99, p.1157–1164, 2008.

XU, Y; DU, W.;LIU, D.. Study on the kinetics of enzymatic interesterification of triglycerides for biodiesel production with methyl acetate as the acyl acceptor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** . v.32 p. 241–245, 2005.

XUAN, J.; LEUNG, M. K. H.; LEUNG, D. Y. C.; NI, M. A review of biomass-derived fuel processors for fuel cell systems. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**.v.13, p. 1301–1313, 2009.

YAN, X.Y e CROOKES, R.J.Reduction Potentials Of Energy Demand And Ghg Emissions In China's Road Transport Sector. **Energy Policy** . v.37, p.658–668, 2009.

YANG, Q.; CHEN, B.; JI, X.; HE, Y. F.; CHEN, G. Q.Exergetic evaluation of corn-ethanol production in China. **Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation**. v.14, p. 2450–2461, 2009.

ZHAO X.; WAKAMATSU Y.; SHIBAHARA M.; NOMURA N.; GELTINGER C.; NAKAHARA T.; MURATA T.; YOKOYAMA K. K. Mannosylerythritol Lipid Is a Potent Inducer of Apoptosis and Differentiation of Mouse Melanoma Cells in Culture**.** **Cancer Research**, n.59, p.482-486,1999.