Diego Valentim Crescente Cara

PRODUÇÃO DE BIOSSURFATANTE POR *Flavobacterium* sp. A PARTIR DE ÓLEO DE SOJA RESIDUAL E FERTILIZANTE COMERCIAL

Orientadores:

Profa. Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.
Prof. Luis Gonzaga Santos Sobral, Ph.D.

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Escola de Química
Março de 2009

PRODUÇÃO DE BIOSSURFATANTE POR *Flavobacterium* sp. A PARTIR DE ÓLEO DE SOJA RESIDUAL E FERTILIZANTE COMERCIAL

Diego Valentim Crescente Cara

Orientadores:

Profa. Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.
Prof. Luis Gonzaga Santos Sobral, Ph.D.

Dissertação Apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos para a Obtenção do Grau de Mestre em Ciências.

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Escola de Química
2009

PRODUÇÃO DE BIOSSURFATANTE POR *Flavobacterium* sp. A PARTIR DE ÓLEO DE SOJA RESIDUAL E FERTILIZANTE COMERCIAL

Diego Valentim Crescente Cara

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada por:

Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc (Orientador)

Luis Gonzaga Santos Sobral, Ph.D. (Orientador)

Fernando Jorge Santos de Oliveira, D.Sc.

Cláudia Duarte da Cunha, D.Sc.

Verônica Maria de Araújo Calado, D.Sc.

Rio de Janeiro
2009

Ficha Catalográfica

Cara, Diego Valentim Crescente

Produção de biossurfatante por *Flavobacterium* sp. a partir de óleo de soja residual e fertilizante comercial/ Diego Valentim Crescente Cara. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2009.

xvii, 71 p.; il.

Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2009.

Orientador(es):Eliana Flávia Camporese Sérvulo e Luis Gonzaga Santos Sobral.

1. Biossurfatante. 2. Produção 3. *Flavobacterium* 4. Óleo de soja 5. Rejeitos industriais 6. Dissertação (Mestrado – UFRJ/EQ). 7. Eliana Flávia Camporese Sérvulo e Luis Gonzaga Santos Sobral.

I. Título.

Réquiem à defesa...

Dados da tese,
dados que rolam,
que lançam à minha **sorte!**
Dados que rolam,
e não **desenrolam**
a minha **tese**

Dados loucos,
atrapalhados.
Dados que dão **certo**!
Outros que dizem nada!
dados de outrora, **sorte.**
Agora puro azar!

Jaz aqui, **estudante**,
antigo jogador
Nasce aqui,
futuro divagador.

Se tudo é,
pois um dia foi.
Se tudo foi,
um dia será.

Desses meus dias no lab
aprendi o que serei,
posto que tudo é **dor**,
e no final,
prazer!

Diego Cara, 08/03/2009.

Nada lhe posso dar que já não exista em você mesmo. Não posso abrir-lhe outro mundo de imagens, além daquele que há em sua própria alma. Nada lhe posso dar a não ser a oportunidade, o impulso, a chave. Eu o ajudarei a tornar visível o seu próprio mundo, e isso é tudo.

Hermann Hesse

Dedico este trabalho aos meus pais por todo apoio, incentivo, dedicação ao longo da minha existência e a minha namorada Thaís, por todo amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Valentim e Natalina, por terem me concebido, educado com muito amor e dedicação, sempre dando valor aos estudos. Vocês são tudo na minha vida, mais que essenciais.

À Thaís, pelo companheirismo e compreensão nas horas de ausência e apoio nas horas difíceis. Com você aprendi a definir a palavra amor.

À minha orientadora Eliana Flávia, por acreditar em mim, no meu trabalho e me apoiar, fazendo por muitas vezes mais que seu papel como orientadora. Serei eternamente grato!

Ao meu orientador Luis Sobral, pela atenção que me tem dado desde o início da minha faculdade, ainda como orientador de Iniciação Científica. São longos sete anos de trabalho e amizade. Sempre juntos!

Ao Professor da Escola de Química, Dr. Márcio Nele e doutorando Anderson Mendes, pelo apoio na realização de algumas análises. Muito obrigado pela receptividade e atenção.

Ao Ronaldo Santos e Andréa Rizzo, por todo apoio no desenvolvimento da tese. Que venham muitos projetos!

Ao Doutorando, M.Sc. Ulrich Vasconcelos. Obrigado pelas tardes divertidas que passamos trabalhando e por muito mais do que possa ser escrito aqui...

Ao pessoal da 107. Como foi excelente compartilhar os meus dias com vocês. Obrigado Cris, Dieguinho, Thiago, Tati, Pati, Thaís, Carol, Andreza e Juliana. Gostaria de agradecer especialmente ao Douglas e Kally, pois estivemos por mais tempo juntos. Sem vocês, certamente esta tese não teria sido concluída. Valeu!

Aos amigos da 109 e ex-109. Camila, Flávia, Jamille, Aike, Japonês, Leonardo, Rafel e Denise. Valeu galera.

Os amigos de turma da EQ: Grazi, Ricardinho, Felipe, Affonso, Pablo, Maíra, Gilberto, muito mangue pra gente ainda estar por vir.

Aos amigos do CETEM: Michel, Gustavo, Rodnei, Rodrigo, Hugo, Giselle, Tati, Patrícia, Clenilson, Natália, Jorginho, Carlos, Júnior, Marion, Renata Lima, Gabrielle, Yaci, Juliana, Ary, Gracie e tantos outros que passei muito tempo junto.

Ao André Ventura, por sempre estar disposto para me explicar o que fosse perguntado sobre química. Valeu Deizinho!

Aos amigos Clenilson e Patrícia por toda ajuda e apoio durante as nossas teses. Guardo carinho especial por vocês.

Ás amigas Sabrina Dias, Bianca Manhães, Natália Franco, Priscila Xavier por todo tempo que trabalhamos juntos, rimos juntos e nos divertimo juntos!!!

À Renata da Matta, pela amizade, carinho, apoio. Ainda tem muito para me ensinar.

Á Débora Monteiro, por existir, apoiar, brigar e me ensinar a ser uma pessoa melhor. Vocês estão no meu coração.

Aos meus irmãos da São Ricardo: Luciano Leite, Roberto Borati, Marco Rocha, Marcos Paulo, Gustavo e Rodrigo Ortigozo, Pablo Villa Secca, Fernando Teixeira, Fábio Menartowicz, Andrey (*in memorian*) e Renan. Vocês são a minha base.

Aos companheiros de várias Sagas: Douglas Guimarães e Gustavo Mafra, com vocês conquistei a América do Sul e vamos conquistar o mundo. Até a próxima!

Aos professores da minha Graduação: Alexandre Loureiro, Douglas Guimarães e Paulo Roberto (*in memorian*). Obrigado sempre pelo apoio e incentivo, sempre acreditando em mim. Vocês são fundamentais para mim.

A todos, que por falha da memória não mencionei, que me ajudaram, apoiaram e incentivaram. Obrigado.

Resumo da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química/UFRJ como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

PRODUÇÃO DE BIOSSURFATANTE POR *Flavobacterium* sp. A PARTIR DE ÓLEO DE SOJA RESIDUAL E FERTILIZANTE COMERCIAL

Diego Valentim Crescente Cara

Março de 2009

Orientadores: Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.

Luis Gonzaga Santos Sobral, Ph.D.

A linhagem *Flavobacterium* sp. AU-1, isolada de solo impactado por hidrocarbonetos, foi testada quanto à capacidade de produzir compostos tensoativos em meio básico mineral suplementado com insumos de baixo custo. Preliminarmente, foram realizados experimentos para seleção da fonte de carbono - glicerol, querosene, óleo de soja in natura (IN), óleo de soja de fritura (DF), açúcar cristal e dextrose P.A. – em função da redução da tensão superficial do meio fermentado. Exceto para glicerol e querosene, o crescimento da bactéria a 30ºC, em frascos Erlenmeyers, sob agitação de 150 rpm por 48 horas, propiciou a produção de biossurfatante, uma vez que a tensão do mosto original de 71 mN/m foi reduzida a 45 mN/m, correspondendo a reduções de TS de 28 a 40%. Também, independentemente da solubilidade da fonte de carbono, a síntese de biossurfactante pela linhagem isolada ocorreu nas primeiras 24 horas de processo, de modo análogo ao crescimento. Entretanto, quando o bioprocesso foi realizado com açúcar cristal (fonte de carbono solúvel) foi evidenciado o aumento da TS na 72ª hora, indicando a degradação do bioproduto. A análise da produção de compostos tensoativos a partir de óleo DF e diferentes fontes de nitrogênio - nitrato de sódio, ureia, levedura residual cervejeira e sulfato de amônio – individualmente e em variadas proporções, através de planejamento de mistura do tipo simplex-lattice [4,3] indicou ser a ureia e o nitrato de sódio, individualmente ($p<0,05$), as mais apropriadas. O teste t de Student, a partir da análise das médias para valores de diluição micelar crítica, indicou que estatisticamente é favorável a substituição do nitrato de sódio pelo fertilizante salitre do Chile, uma fonte de nitrogênio economicamente mais vantajosa. A partir de um planejamento fatorial completo 2^2 com ponto central foi possível determinar que as concentrações de óleo de soja DF e de fertilizante são estatisticamente significantes para a produção de biossurfatante pela linhgem de *Flavobacterium* isolada. A maior quantidade de biossurfactante, determinada pela análise da diluição micelar crítica (DMC), foi alcançada em 24 horas de processo para meio constituído de 100 mL/L de óleo de soja DF e 8,8 g/L de salitre do Chile.

Abstract of Dissertation presented to The Pos-graduation Course on Chemical and Biochemical Processes Technology of the School of Chemistry of The Federal University of Rio de Janeiro/UFRJ as part of the requirements for the Master of Science degree.

PRODUCTION OF BIOSSURFACTANT BY *Flavobacterium* sp. FROM RESIDUAL SOYBEAN OIL AND COMMERCIAL FERTILIZER

Diego Valentim Crescente Cara

Março de 2009

Supervisors: Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc

Luis Gonzaga Santos Sobral, Ph.D.

The *Flavobacterium* sp. AU-1 strain, isolated from hydrocarbon–bearing soil, was tested as the capacity to produce active surface agents from the cultivation in mineral alkaline medium supplemented with low cost raw materials. Preliminarily, experiments were accomplished to select the carbon source (glycerol, kerosene, *in natura* soy oil, frying soy oil, granulated sugar and dextrose P.A.) bearing in mind the reduction of the final surface tension of the fermented medium. Except glycerol and kerosene, the bacterium growth at 30ºC, in Erlenmeyer's flasks, under stirring at 150 rpm for 48 hours, provided the production of bio-surfactant, since the surface tension of original must was 71 mN/m and was reduced to 45 mN/m, corresponding to a reduction of ST from 28% to 40%. In addition, independent of the solubility of carbon source, the synthesis of bio-surfactant by the isolated strain occurred in the first 24 hours of process, in a similar way to growth. However, when the bio-process was conducted with granulated sugar (soluble carbon source) it was shown an increase of ST in the 72nd hour, indicating the degradation of bio-product. The analysis of surface active compounds production using DF oil and different sources of nitrogen (P.A sodium nitrate, P.A. urea, brewer residual yeast and P.A. ammonium sulphate), through a mixture planning of the simplex-lattice type [4,3], indicated to be individually the urea or P.A sodium nitrate the most appropriate chemicals for the CMD^{-1} reduction ($p<0.05$). The *t* test of Student from the analysis of average values for the CMD, has indicated that statistically favours the replacement of the P.A. sodium nitrate by fertilizer Chile's saltpetre, a more cost-effective source of nitrogen. From a full factorial design 2^2 with central point it was possible to determine that the concentration of soybean oil DF and fertilizer are statistical significant for the production of bio-surfactant by the isolate strain of *Flavobacterium.* The largest amount of bio-surfactant, determined by the DMC analysis, was achieved in 24 hours in case of medium consisting of 100 mL/L of soybean oil DF and 8.8 g/L of Chile's saltpetre.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1: Representação esquemática da estrutura de um surfatante 5

Figura 3.2: Representação da alocação dos surfatantes na superfície de um líquido apolar 6

Figura 3.3: Esquema mostrando as forças moleculares envolvidas na formação da membrana (tensão superficial) 7

Figura 3.4: A saturação da superfície e B monômeros em solução 8

Figura 3.5: Tensão superficial, tensão interfacial e solubilidade em função da concentração de surfatante 9

Figura 3.6: Representação esquemática da solubilização de compostos apolares no interior de micelas 9

Figura 3.7: Representação esquemática de algumas estruturas organizadas de surfatantes 10

Figura 3.8: Estrutura de um ramnolipídio 13

Figura 3.9: Estrutura de um soforolipídio 13

Figura 3.10: Estrutura de um trealose lipídio 14

Figura 3.11: Estrutura de um fosfatidilglicerol 14

Figura 3.12: Estrututra da surfactina 15

Figura 3.13: Estrutura do emulsa 15

Figura 3.14: Estrutura do flavolipídio e sua correlação com outros biossurfatantes 16

Figura 3.15: Produção, consumo interno e exportação de óleo de soja. 20

Figura 4.1: Tetraedro representando os pontos de amostra do planejamento por mistura do tipo Simplex-lattice [4,3] e ponto central 39

Figura 4.2: Diagrama de quadros indicando a ordem de execução dos experimentos baseados nos resultados obtidos. 43

Figura 5.1: Tensão superficial final (mN/m) e % da variação da tensão superficial utilizando seis diferentes fontes de carbono 44

Figura 5.2: Efeito da variação da fonte de carbono e tempo na tensão superficial final. 47

Figura 5.3: Gráfico de Pareto para as variáveis do modelo quadrático do ΔDMC^{-1}. 52

Figura 5.4: Superfície de resposta para Nitrato de Sódio, Ureia e Sulfato de Amônio. Modelo quadrático e nível da levedura igual a zero. 53

Figura 5.5: Gráfico da distribuição normal dos resíduos como resposta ΔDMC^{-1}. 54

Figura 5.6: Gráfico Box & Whisker para o teste t de *Student* para a comparação entre as médias obtidas na produção de biosurfatante utilizando como fonte de nitrogênio o reagente P.A. ou o fertilizante Salitre do Chile 56

Figura 5.7: Gráfico de Pareto para planejamento 2^2 com ponto central 58
Figura 5.8: Gráfico de médias marginais tendo ΔDMC^{-1} como resposta 59
Figura 5.9: Superfície de resposta tendo ΔDMC^{-1} como resposta 60
Figura 5.10: Distribuição normal dos resíduos do planejamento 2^2 com ponto central 60

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1: Exemplos de surfatantes comerciais e classificação quando a porção hidrofilica 6

Tabela 3.2: Classificação dos biossurfatantes produzidos por diferentes micro-organismos 12

Tabela 3.3: Composição de ácidos graxos (%) de óleo de soja em diversos tempos de utilização no processo de fritura por imersão de batata palito 21

Tabela 3.4: Vantagens e desvantagens na utilização de substratos de baixo custo para a produção de biossurfatantes 24

Tabela 3.5: Diferentes aplicações dos biossurfatantes químicos e forma de atuação 25

Tabela 4.1: Composição básica do resíduo seco de *Saccharomyces cerevisae* 31

Tabela 4.2: Composição dos meios de cultura utilizados para a produção de biossurfatante por *Flavobacterium* sp. 32

Tabela 4.3: Fontes de carbono empregadas e respectivas concentrações no meio para produção de biossurfatante 35

Tabela 4.4: Interpretações para os valores p obtidos nos testes de hipóteses 37

Tabela 4.5: Composição em g/L das diferentes fontes de nitrogênio utilizadas 38

Tabela 4.6: Variáveis escalonadas utilizadas no planejamento 42

Tabela 5.1: Componentes empregados (em %) em cada ensaio e as respostas obtidas 50

Tabela 5.2: ANOVA para o ajuste de diferentes modelos à resposta ΔDMC^{-1}. 51

Tabela 5.3: Resultados do teste t de *Student* para a comparação das médias 55

Tabela 5.4: Variáveis escalonadas utilizadas no planejamento 57

Tabela 5.5: ANOVA do planejamento 2^2 com ponto central 57

SUMÁRIO

RESUMO x

ABSTRACT xi

ÍNDICE DE FIGURAS xii

ÍNDICE DE TABELAS xiv

1 INTRODUÇÃO **1**

2 OBJETIVOS **4**

2.1 Objetivo Geral 4

2.2 Objetivos Específicos 4

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **5**

3.1 Surfatantes 5

3.2 Biossurfatantes 11

3.2.1 Aspectos gerais 11

3.2.2 Tipos de biossurfatantes 12

3.3 O gênero *Flavobacterium* 17

3.4 Função biológica dos surfatantes 18

3.5 Insumos de baixo custo 19

3.5.1 Óleo de soja 19

3.5.2 Levedura residual cervejeira 21

3.6 Fatores que influenciam na produção de biossurfatante 22

3.7 Aplicação dos biossurfatantes 25

3.8 Planejamento experimental 27

4 MATERIAIS E MÉTODOS **29**

4.1 Micro-organismos 29

4.2 Manutenção das culturas e preparo de inóculo 29

4.3 Insumos 30

4.3.1 Óleo de soja residual (DF) 30

4.3.2 Óleo de soja IN 31

4.3.3 Açúcar cristal 31

4.3.4 Levedura residual cervejeira 31

4.3.5 Fertilizante Salitre do Chile 31

4.4 Meios de cultura 32

4.5 Condições operacionais 33

4.6 Pureza da cultura 33

4.7 Determinações analíticas 34

4.7.1 Concentração celular 34

4.7.2 Tensão superficial 34

4.7.3 Diluição micelar crítica (DMC) 34

4.7.4. pH 35

4.8 Experimentos 35

4.8.1 Efeito da fonte de carbono 35

4.8.2 Crescimento e síntese do biossurfatante em função do tempo 36

4.9 Planejamento estatístico 36

4.9.1 Estudo da co-integração quali e quantitativa de fontes de nitrogênio 37

4.9.2 Análise comparativa entre nitrato de sódio P.A. e fertilizante comercial (Salitre do Chile) 41

4.9.3 Otimização da relação carbono (óleo de soja DF) e nitrogênio (fertilizante) 41

4.9.3.1 Planejamento fatorial completo 2^k (k = 2) com ponto central 42

4.10 Sumário cronológico 43

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES **44**

5.1 Efeito da fonte de carbono 44

5.2 Crescimento e síntese do biossurfatante em função do tempo 47

5.3 Estudo da co-integração quali e quantitativa de fontes de nitrogênio 49

5.4 Caracterização parcial do fertilizante Salitre do Chile 58

5.5 Análise comparativa entre nitrato de sódio P.A. e fertilizante comercial (Salitre do Chile) 58

5.6 Otimização da relação carbono (óleo de soja DF) e nitrogênio (fertilizante) 60

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS **65**

7 CONCLUSÕES **66**

8 SUGESTÕES **67**

9 REFERÊNCIAS **68**

1 INTRODUÇÃO

O termo surfatante tem sua origem na abreviatura da expressão em inglês *Surface Active Agents* (CRISTOFI *et* ISHIVA, 2002). Na língua portuguesa, este termo é muito usado, embora fosse mais correto denominar estes compostos de tensoativos. Os surfatantes são moléculas anfifílicas ou anfipáticas, visto serem constituídas de duas frações distintas – apolar (hidrofóbica) e polar (hidrofílica). Por essa razão, os surfatantes possuem a capacidade de interagir com líquidos de diferentes características, como, por exemplo, misturas de óleo (apolar) e água (polar). Também podem se posicionar na superfície do fluido formando uma película ou filme, resultando na redução da tensão superficial na interface líquido/ar (ZANA, 2005). Essas características conferem aos surfatantes diversas possibilidades de aplicação para uso doméstico ou industrial, tais como: detergência, emulsificação, lubrificação, espumante, molhabilidade, solubilização e dispersão de fases (URUM *et* PEKDEMIR, 2004; MULLIGAN, 2005).

Em geral, os surfatantes comercializados são sintetizados a partir de hidrocarbonetos do petróleo. No entanto, diferentes sistemas biológicos são capazes de produzir moléculas com propriedades tensoativas, como: plantas (saponinas); animais (sais biliares) e micro-organismos, onde diferentes espécies microbianas são capazes de produzir diferentes moléculas tensoativas. No organismo produtor, essas moléculas são fundamentais em vista das diferentes funções que desempenham. Mas, na maioria das vezes, favorecem a interação do micro-organismo com o ambiente, permitindo o seu desenvolvimento a partir de compostos insolúveis em água (HAMME, SINGH *et* WARD, 2006).

Os biossurfatantes de origem microbiana podem ser produzidos por biotransformações de hidrocarbonetos de petróleo, bem como de matérias-primas renováveis, e se tem dado especial atenção aos resíduos industriais, como por exemplo: glicerol, óleos vegetais já utilizados em frituras, resíduos de monoculturas e de processamento vegetal, entre outros (DESAI *et* BANAT, 1997; MULLIGAN, 2005). Essa busca por insumos de menor custo se faz necessária, visto que os surfatantes químicos apresentam custo inferior aos biossurfatantes, sendo, por essa razão, mais comercializados. Ainda no contexto de redução de custos, é indicada a utilização dos fertilizantes comerciais em substituição aos produtos químicos comumente empregados na formulação de meios de cultura. Oliveira *et al.* (2006) conseguiram obter quantidades consideráveis de ramnolipídio pelo cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* FR. a partir de óleo de dendê e N:P:K (10:10:10).

O Brasil se destaca no cenário econômico internacional como maior exportador de

soja do mundo, tendo no ano comercial de 2007, uma área cultivada de 22 milhões de hectares destinados à produção do grão, gerando 23,7 bilhões de toneladas de grãos de soja, correspondentes à uma arrecadação de 6,7 bilhões de dólares. O complexo óleo, farelo e grão de soja teve uma participação de cerca de 7% na balança comercial brasileira, do total negociado no mesmo ano (www.abiove.com.br, 2008). O óleo de soja apresenta diferentes aplicações como, por exemplo, na produção de biodiesel. Porém, no Brasil, esse óleo vegetal é, sobretudo, direcionado para o setor alimentício, particularmente para a fritura por imersão de alimentos, seja em residências, pequenos comércios (lanchonetes, *fast-foods,* etc.), e no setor industrial, em especial, na fritura de batatas. O óleo de soja é o de maior consumo no mercado brasileiro, basicamente, porque os demais óleos vegetais (canola, azeite de oliva, girassol, etc) apresentam custo superior. Consequentemente, o óleo de soja procedente da fritura de alimentos se apresenta como uma fonte alternativa de carbono de baixo custo e grande disponibilidade em todo o território nacional. Lima *et al.* (2007; 2009) utilizaram óleo de soja de fritura como fonte de carbono para a produção de biossurfatante em quantidade compatível e, em alguns casos, inclusive superior aos resultados referidos em trabalhos disponíveis na literatura.

Ademais, o óleo apresenta modificação de sua composição após uso em alguns ciclos de fritura, o que o torna um rejeito industrial potencialmente poluente, cujo descarte se realizado sem tratamento, é extremamente danoso para o ambiente (NITSCHKE *et* PASTORE, 2002). A sua importância econômica reside na fabricação do sabão e como fonte de carbono para processos fermentativos.

Em face da capacidade de várias espécies microbianas de produzir biossurfatantes de estruturas químicas diversas, tem sido dada grande importância ao isolamento de micro-organismos na busca de potenciais produtores. Em geral, são coletadas amostras em locais contaminados com moléculas apolares como, por exemplo, ambientes contaminados com petróleo e seus derivados, ou ainda, em misturas que contenham álcool (BOGNOLO, 1999; HOLMBERG, 2001; BODOUR, DREES *et* MAIER, 2003; CUNHA *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.,* 2006; BALOGUN *et* FAGADE, 2008; PORNSUNTHORNTAWEE *et al.,* 2008; LIMA *et al.,* 2009). Essa escolha se baseia nos aspectos ecofiosiológicos dos processos degradativos que ocorrem em solos impactados com compostos orgânicos recalcitrantes, visto que, existem micro-organismos capazes de sobreviver nestas condições adversas e, até mesmo, utilizar o contaminante em seus processos metabólicos. Geralmente, os hidrocarbonetos são utilizados como fonte energética para a manutenção das funções vitais da célula, e como fonte de carbono para seu crescimento, ou seja, aumento da biomassa (MOREIRA *et*

SIQUEIRA, 2006). A produção de biossurfatantes, entre outras funções, é uma das formas encontradas pelos micro-organismos para conseguir metabolizar os hidrocarbonetos. A parte lipofílica (característica apolar) do biossurfatante se liga ao contaminante (também com característica apolar), facilitando assim, à sua entrada (pinocitose) na célula, e sua posterior mineralização (metabolização, ou seja, crescimento plástico e transformação em CO_2) (HOLMBERG, 2001).

Em 2003, o gênero *Flavobacterium* foi primeiramente descrito como possível produtor de agente tensoativo por BODOUR, DREES *et* MAIER. (2003). Nesta publicação, esses autores fizeram um rastreamento de potenciais produtores de biossurfatantes, obtendo mais de 1300 culturas isoladas de solos, não contaminados e contaminados com petróleo, das quais 45 se mostraram potencialmente produtoras, e dentre estas, um representante do gênero supracitado. No ano seguinte, esses autores obtiveram os flavolipídios e os caracterizaram empregando diversas técnicas analíticas (BODOUR *et al.,* 2004).

A diversidade de micro-organismos produtores de biossurfatantes é acompanhada pela quantidade elevada de fatores que influenciam os processos fermentativos, de natureza física e química, bem como aqueles inerentes ao próprio micro-organismo, já que diferentes linhagens da mesma espécie respondem diferenciadamente aos mesmos fatores. A diferença do metabolismo microbiano de diferentes linhagens da mesma espécie está diretamente relacionada com fatores genéticos (DESAI *et* BANAT, 1997). Um dos fatores mais críticos para o crescimento microbiano é a fonte de carbono. Esta pode se apresentar na forma solúvel (açúcar e álcool, por exemplo) em água ou insolúvel, comos os óleos vegetais (THANIYAVARN *et al*., 2006; ABOUSEOUD *et al*., 2008).

Como em qualquer processo produtivo, busca-se sempre a redução dos custos e maximização dos rendimentos. No caso dos processos fermentativos, a otimização do rendimento e da produtividade pode ser realizada pelo estudo das variáveis que influenciam o processo. Já a redução de custo, faz-se pela busca de matérias-primas de menor custo dos que as de emprego atual.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo geral avaliar a potencialidade de uma linhagem isolada de *Flavobacterium* sp. em produzir compostos com propriedades tensoativas a partir de insumos de baixo custo e alta disponibilidade.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o emprego de fontes de carbono de baixo custo apropriadas para a biossíntese do produto;
- ✓ Comparar o crescimento do micro-organismo e a produção do tensoativo biológico em meios de cultura constituídos de fonte de carbono solúvel (açúcar cristal) e insolúvel (óleo de soja in natura e residual).
- ✓ Verificar os efeitos qualitativos e quantitativos de quatro diferentes fontes de nitrogênio, através de planejamento experimental do tipo mistura;
- ✓ Comparar a utilização de nitrato de sódio grau P.A. e o seu correspondente comercial (fertilizante salitre do Chile), através de técnicas estatísticas.
- ✓ Avaliar as melhores concentrações de carbono (óleo de soja de fritura) e de nitrogênio (fertilizante salitre do Chile) para a produção de flavolipídios em escala de bancada (frascos agitados) através de planejamento experimental 2^2 com ponto central.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Surfatantes

Os surfatantes são compostos anfifílicos, termo usado para denominar uma ampla classe de moléculas que em comum apresentam em sua estrutura uma parte hidrofílica (cabeça) e outra hidrofóbica (cauda) (Figura 3.1). A “cauda” geralmente é composta por uma ou duas cadeias carbônicas hidrofóbicas (alifáticas, linear ou ramificada; grupos aromáticos ou policíclicos). A “cabeça”, de acordo com a sua carga, permite classificar os surfatantes em: não-iônicos, iônicos e zwitteriônicos ou anfóteros, conforme Tabela 3.1 (ZANA, 2005; HAMME, SINGH *et* WARD, 2006).

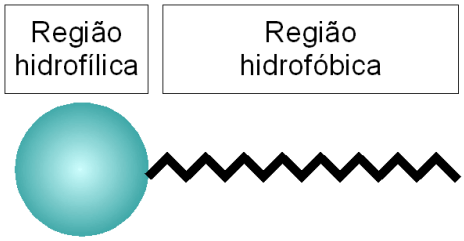


Figura 3.1 - Representação esquemática da estrutura de um surfatante.

Segundo Maniasso (2001), os surfatantes zwitteriônicos podem apresentar prevalência de uma das espécies, aniônica ou catiônica, dependendo do pH da solução e da conformação da sua estrutura.

A característica dual dos surfatantes é responsável pelo seu comportamento peculiar em água, visto que as porções hidrofóbicas são energeticamente desfavoráveis no que diz respeito ao contato com a água, pois esta é polar (ZANA, 2005). Em água, os surfatantes tendem a se alocar na superfície do sistema, na interface água/ar: a região polar do surfatante se situa na água e a região apolar voltada para a interface com o ar (Figura 3.2). Esse comportamento ocasiona a redução da tensão superficial da água.

Tabela 3.1 - Exemplos de surfatantes comerciais e classificação quanto à porção hidrofílica

Tipo	Agente tensoativo
Catiônico	Brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB)
	Brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB)
	Cloreto de cetilpiridino (CICP)
Aniônico	Dodecil sulfato de sódio (SDS)
	Dihexadecil fosfato (DHF)
	Bis(2-etilhexil) sulfosuccinato sódico (Aerosol OT)
Não iônico	Polioxietileno (9-10) p-tercotil fenol (Triton X-100)
	Polioxietileno (23) dodecanol (brij 35)
	Polisorbatos (Incluindo Tween)
Zwitteriônico	3-(dodecildimetil amônio) propano 1-sulfato (SB-12)
	4-(dodecildimetil amônio) butirato (DAB)

Fonte: MANIASSO, 2001; HAMME, SINGH *et* WARD, 2006.

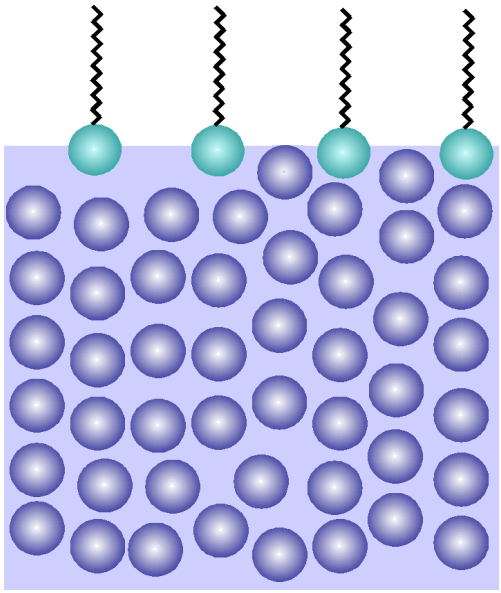


Figura 3.2 - Representação da alocação dos surfatantes na superfície de um líquido polar (ZANA, 2005).

No interior do líquido, as moléculas da água interagem com as moléculas vizinhas, em todos os sentidos, o que possibilita a aproximação das moléculas, por conta das forças de atração, mas a ação das forças repulsivas impede que duas ou mais moléculas ocupem o mesmo espaço ao mesmo tempo, criando um distanciamento entre elas (Figura 3.3). Por outro lado, as moléculas situadas na superfície livre do líquido interagem apenas com as moléculas situadas lateralmente e as localizadas bem abaixo da superfície. Como resultado das interações que ocorrem na superfície e no interior do líquido, tem-se a formação na superfície da água de uma espécie de membrana, representada pela tensão superficial, uma vez que para rompê-la é necessário aplicar uma determinada força, que pode ser definida como “a medida da energia livre da superfície por unidade de área necessária para trazer uma molécula do interior do líquido para a superfície ”(MANIASSO, 2001; ZANA, 2005).

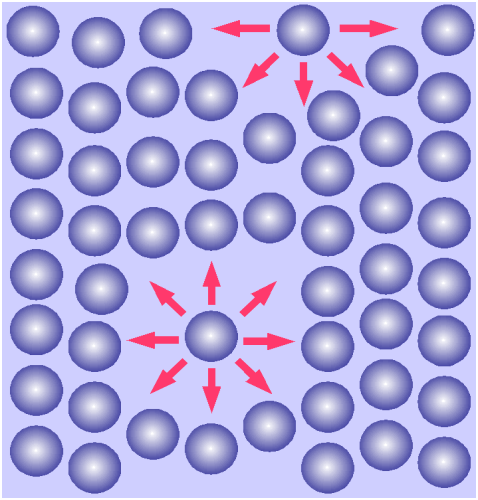


Figura 3.3 - Esquema mostrando as forças moleculares envolvidas na formação da membrana (tensão superficial) (ZANA, 2005).

Quando a concentração de surfatante na solução cresce, a quantidade de surfatante na camada superior do sistema aquático (interface ar/água - Figura 3.4 A) cresce até o ponto em que a superfície satura (Figura 3.4 B). A partir desse ponto, a concentração em solução pode ser, ainda, incrementada e o surfatante pode se apresentar, ainda, na forma molecular dispersa na solução (Figura 3.4 B).

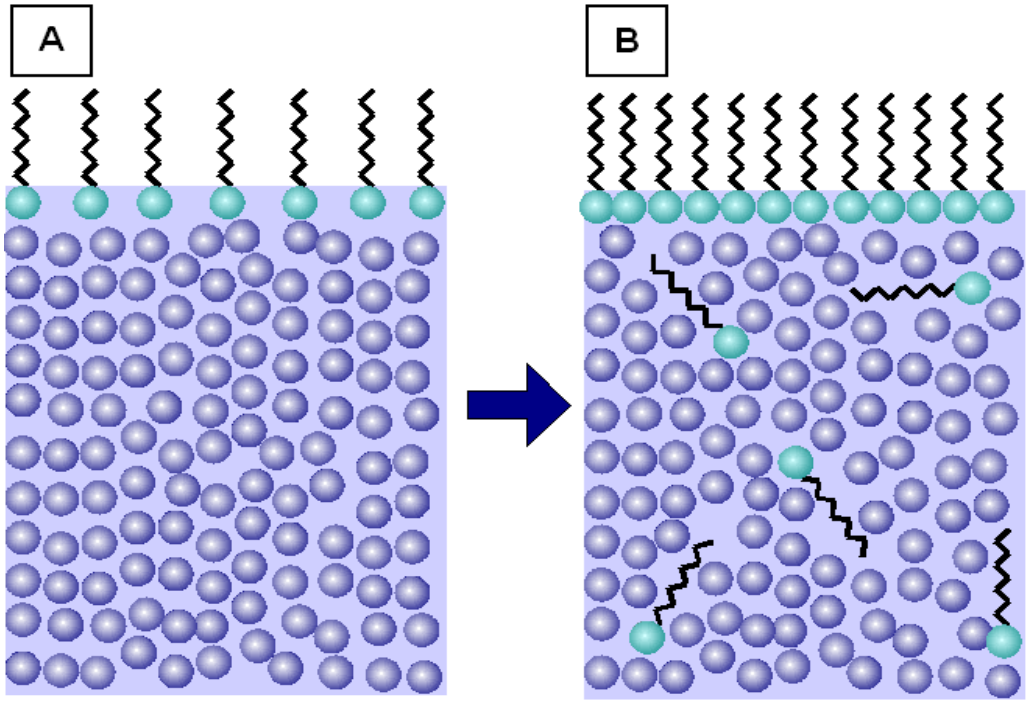


Figura 3.4 – Representação da interação das moléculas de surfatante em um sistema água-ar (A: saturação da superfície;B: monômeros em solução).Fonte: ZANA, 2005.

Contudo, a energia livre do sistema cresce em virtude do aumento da concentração do surfatante em solução, elevando, assim, o número de cadeias hidrofóbicas em contato com a água. A partir desse momento, conforme pode ser visualizado na Figura 3.5, as moléculas tendem a se auto-organizar em micelas para diminuir a energia livre do sistema (ZANA, 2005). Micela (do latim *mic(a)* = grão; e *ella* = sufixo para pequeno) indica o aspecto visual da estrutura formada (FUHRHOP et KÖNING, 1999).

As micelas são espécies termodinamicamente estáveis no equilíbrio químico quando os surfatantes estão livres em solução, sendo um processo espontâneo e reversível (ZANA, 2005). Devido à presença de surfatantes, uma menor energia é requerida para trazer uma molécula até a superfície e a tensão superficial é reduzida. Por exemplo, um bom surfatante permite baixar a tensão superficial da água de 72 para 35mN/m (MULLIGAN, 2005). De modo análogo, a presença de surfatante pode reduzir a energia entre dois líquidos imiscíveis, denominada tensão interfacial. Por isso, a eficácia de um surfatante costuma ser determinada por sua capacidade de reduzir a tensão superficial ou a tensão interfacial dos sistemas.

As micelas se formam após uma determinada concentração, denominada Concentração Micelar Crítica (CMC). Essa concentração de surfatante corresponde a menor

quantidade requerida para maior redução da tensão superficial, a qual é influenciada pela temperatura, força iônica e pH (MULLIGAN, 2005).

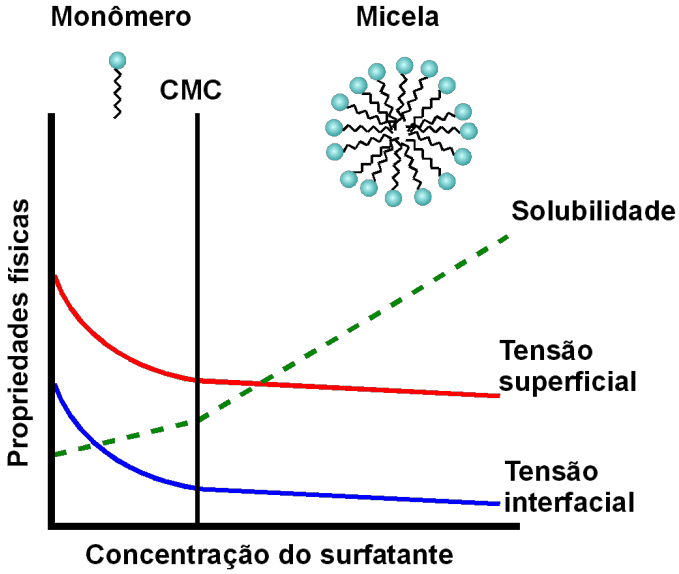


Figura 3.5 - Tensão superficial, tensão interfacial e solubilidade em função da concentração de surfatante (MULLIGAN, 2005).

Os compostos insolúveis ou pouco solúveis em água podem ser solubilizados no interior das micelas, na região apolar, como exposto na figura 3.6 (MULLIGAN, 2005).

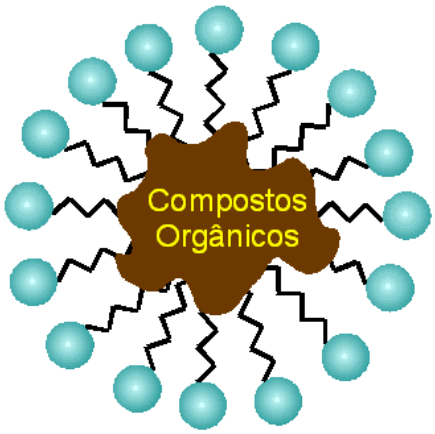


Figura 3.6 - Representação esquemática da solubilização de compostos apolares no interior de micelas.

Alguns surfatantes podem se auto-organizar na forma de camadas duplas chamadas vesículas, ou lipossomos quando formado por fosfolipídios (ZANA, 2005). Tais estruturas (Figura 3.7) são influenciadas pela natureza do solvente, que este apolar ou polar, a possibilidade da interação com íons vizinhos e pela natureza dos monômeros do surfatante (SANZ-MEDEL *et al*., 1999).

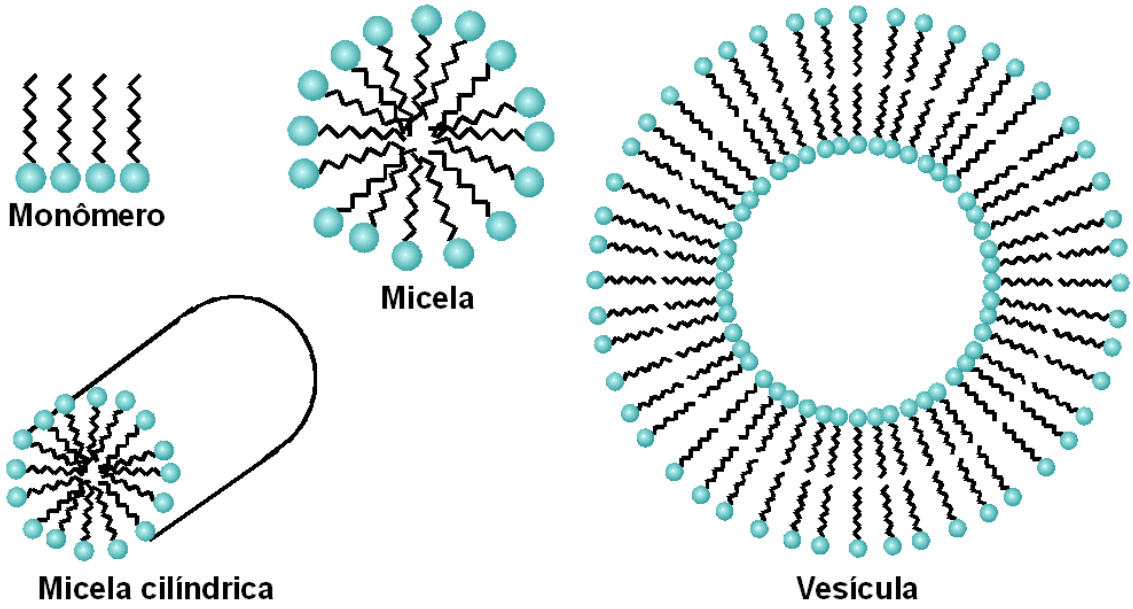


Figura 3.7 - Representação esquemática de algumas estruturas organizadas de surfatantes (SANZ-MEDEL *et a*l., 1999).

Vesículas, em geral, são bem menos dinâmicas que as micelas e formam agregados mais estáveis. A dinâmica de interação de solutos com as vesículas é controlada pela estabilidade cinética vesicular. Essa interação, responsável pela manutenção de solutos no interior de vesículas, é bem maior do que nas micelas (ZANA, 2005).

3.2 Biossurfatantes

3.2.1 Aspectos gerais

Segundo Bognolo (1999), o termo biossurfatante é definido como uma molécula tensoativa (surfatante) produzida por células vivas, como vegetais (como saponinas), micro-organismos (glicolipídios, por exemplo) e, inclusive, por animais de grande complexidade estrutural (incluindo o homem) como, por exemplo, os ácidos biliares.

Pelo fato do reduzido tempo de geração dos micro-organismos (tempo em que uma célula leva para formar outra idêntica por divisão mitótica, ou seja, sem perda de material genético) em comparação com o tempo de geração de plantas e/ou animais (formação de novos indivíduos completos ou crescimento celular em meio apropriado), os primeiros são preferenciais como fontes produtoras de tensoativos biológicos (LANG, 2002). Apesar de sua importância biológica, os biossurfatantes têm sido alvo de pesquisas sistemáticas há menos de meio século, inseridos no contexto de trabalhos direcionados para o desenvolvimento de novos antibióticos, quando se observou que muitas das culturas haviam desenvolvido um comportamento tensoativo ao final do crescimento (BOGNOLO, 1999).

Apesar da grande diversidade estrutural dos biossurfatantes, esses apresentam alguns aspectos em comum, tais como (DESAI *et* BANAT, 1997; NITSCHKE *et* PASTORE, 2002; REIS, SÉRVULO *et* DE FRANÇA, 2004; MULLIGAN, 2005; HAMME, SINGH *et* WARD, 2006):

- Baixa toxicidade - os biossurfatantes são moléculas naturais e, comprovadamente, não causam danos aos seres vivos estruturalmente mais complexos (plantas e animais), embora alguns possam ter ação antimicrobianos;
- Biodegradabilidade - são facilmente degradáveis na água e no solo, o que os torna adequados para diferentes aplicações ambientais ;
- Tolerância à temperatura, pH e força iônica - são moléculas naturalmente produzidas por micro-organismos em diferentes condições ambientais para exercer diferentes funções. Evolutivamente, foram selecionadas as moléculas estáveis e ativas nas condições ambientais mais adversas. Alguns tensoativos biológicos são capazes de suportar concentração de até 10% de NaCl, enquanto uma concentração salina de 2-3% é suficiente para inativar surfatantes químicos convencionais (BOGNOLO, 1999).

3.2.2 Tipos de biossurfatantes

A maior parte desses compostos são aniônicos ou neutros. Apenas alguns são catiônicos, como os que apresentam um grupamento amino. A porção hidrofóbica da molécula é constituída de uma ou muitas cadeias longas de ácidos graxos, com um número entre 10 e 18 átomos de carbono, enquanto a porção hidrofílica pode ser um carboidrato, um aminoácido, um peptídeo cíclico, fosfato, ácido carboxílico ou álcool (BANAT, 1995; BOGNOLO, 1999; MULLIGAN, 2005).

Uma forma de classificar os biossurfatantes é através de sua massa molecular (Tabela 3.2). As moléculas de baixa massa molecular baixam a tensão superficial de forma mais eficiente, enquanto as de alta massa molecular se caracterizam por formar emulsões de sistemas óleo/água mais estáveis. A massa molecular dos biossurfatantes, geralmente, situa-se entre 500 e 1500 Da e seu valor de CMC varia de 1 a 300 mg/L (ROSENBERG *et* RON, 1999; BODOUR *et al*, 2004; HAMME, SINGH *et* WARD, 2006).

Tabela 3.2 – Classificação dos biossurfatantes produzidos por diferentes micro-organismos.

Classe	Biossurfatante	Micro-organismo
Baixa massa molecular	Ramnolipídio	*Pseudomonas aeruginosa, Serratia rubidea*
	Trealolipídios	*Arthrobacter paraffineus, Rhodococcus erythropolis,*
	Soforolipídios	*Candida lipolytica, Torulopsis bombicola*
	Celobioselipídios	*Ustila maydis*
	Surfactina	*Bacillus subtilis, B. papumilis*
	Fosfolipídios	*Acinetobacter* sp., *Acidithiobacillus thiooxidans*
	Lipopeptídios	*Bacillus subtilis, B. papumilis, B. licheniformis, P.syringae, P. fluorescens*
	Flavolipídíos	*Flavobacterium* sp.
	Gramicidina	*Bacillus brevis*
	Serrawetina	*Serratia marcescens*
Alta massa molecular	Alasan	*Acinetobacter redioresistens*
	Emulsan	*Acinetobacter calcoaceticus*
	Biodispersan	*Acinetobacter calcoaceticus*
	Liposan	*Candida lipolytica*

Fonte: ROSENBERG *et* RON, 1999 e HAMME, SINGH *et* WARD, 2006.

A presença de diferentes porções hidrofílicas faz com que os biossurfatantes sejam agrupados em diferentes classes, de acordo com sua composição, sendo eles:

Glicolipídios – São os biossurfatantes mais conhecidos. São constituídos por carboidratos (açúcares) combinados com ácidos alifáticos ou hidroxialifáticos (DESAI *et* BANAT, 1997). Por vezes, a mesma espécie microbiana é capaz de produzir diferentes tipos de glicolipídios, dependendo da fonte de carbono disponível para seu crescimento (DESAI *et* BANAT, 1997; COSTA, NITSCHKE *et* CONTIEIRO, 2008). Para exemplificar algumas estruturas de glicolipídios, a seguir são apresentadas as figuras 3.8, 3.9 e 3.10.

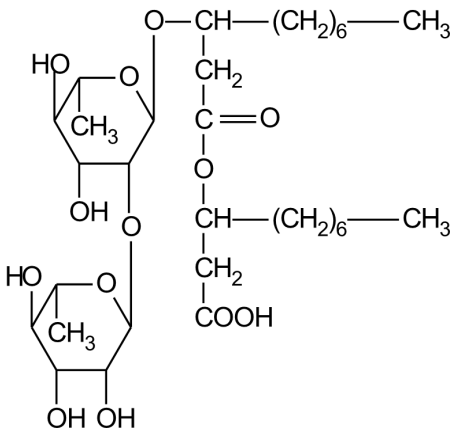


Figura 3.8 - Estrutura de um ramnolipídio (DESAI *et* BANAT, 1997).

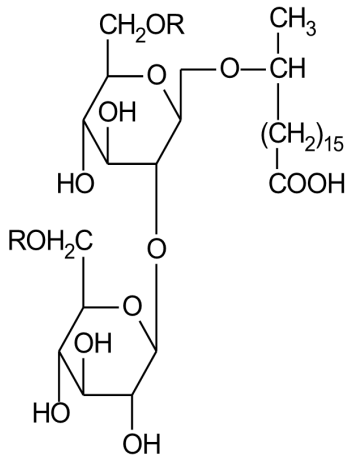


Figura 3.9 - Estrutura de um soforolipídio (DESAI *et* BANAT, 1997).

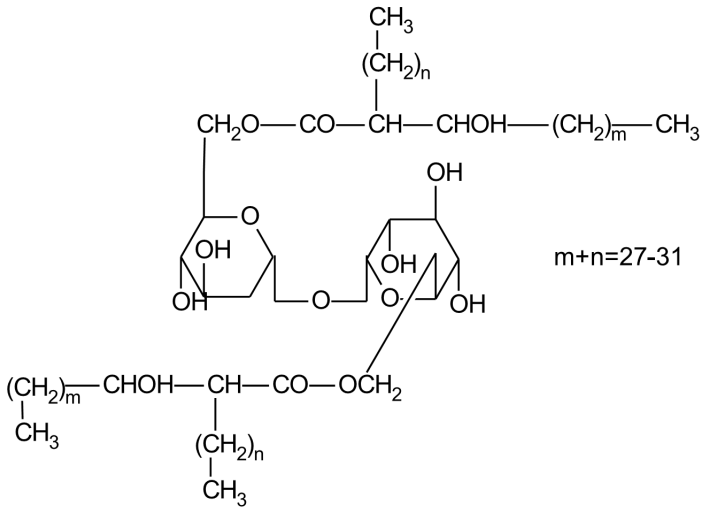


Figura 3.10 - Estrutura de um trealose lipídio (DESAI *et* BANAT, 1997).

Fosfolipídios – São formados por uma molécula de glicerol unida a dois ácidos graxos por meio de ligações éster e a um grupamento fosfato. Quando determinadas espécies de bactérias e leveduras são crescidas em meio com grandes concentrações de hidrocarbonetos, ocorre um aumento considerável do teor de fosfolipídios dentro das células microbianas (BOGNOLO, 1999). Beebe *et* Umbreit (1971) relataram a produção de três diferentes fosfolipídios em meio exaurido (após o crescimento) para *Acidithiobacillus thiooxidans*, tendo S^0 (insolúvel) como fonte de energia. O fosfolipídio encontrado em maior proporção foi o fosfatidilglicerol.

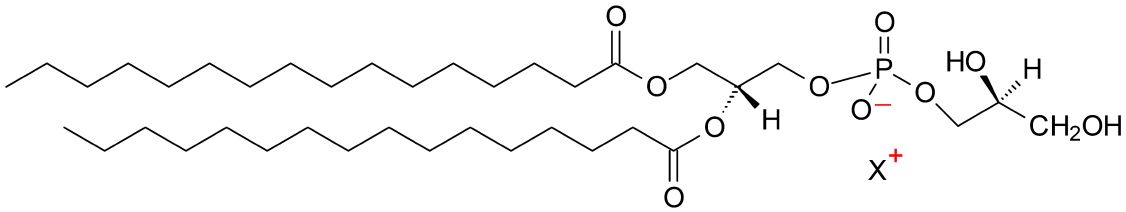


Figura 3.11 - Estrutura de um fosfatidilglicerol.

Lipopeptídeos – São compostos produzidos, principalmente, por espécies do gênero *Bacillus*. Essas moléculas apresentam propriedades tensoativas, sendo que algumas também possuem propriedades antimicrobianas. São exemplos de lipopeptídeos: viscosina, subtilisina e surfactina (Figura 3.12) (DESAI *et* BANAT, 1997).

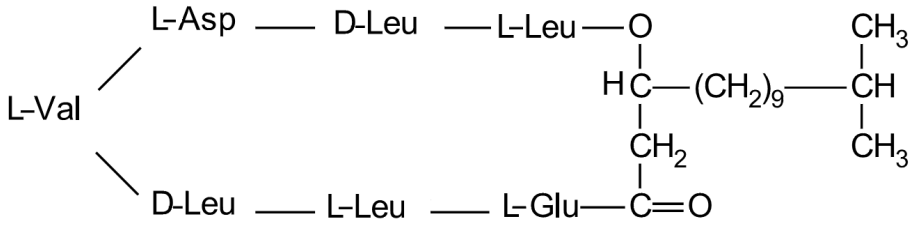


Figura 3.12 - Estrututra da surfactina (DESAI *et* BANAT, 1997).

Polimérico – Emulsan (Figura 3.13) é o biossurfatante polimérico mais estudado. É formado por um complexo de polissacarídeos e proteínas. *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 produz este potente bioemulsificador (DESAI *et* BANAT, 1997).

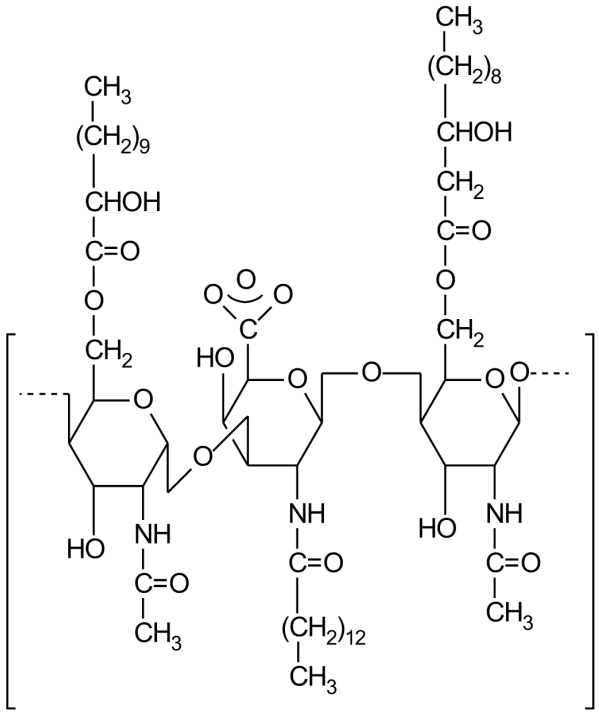
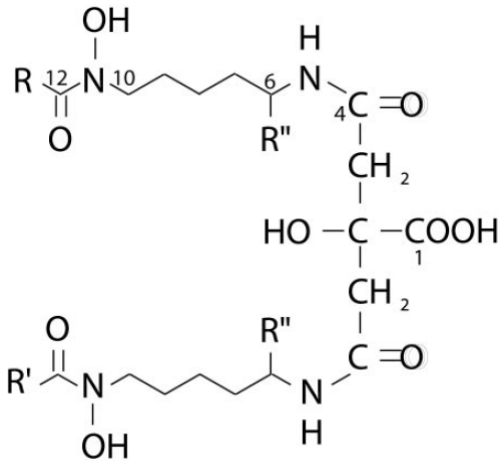


Figura 3.13 - Estrutura do emulsan (DESAI *et* BANAT, 1997).

Flavolipídios – Nova classe de biossurfatantes, primeiramente caracterizados por Bodour *et al.* (2004). A estrutura do flavolipídio é mostrada na Figura 3.14. Os grupamentos polares de todos os flavolipídios foram previamente determinados como estruturalmente semelhante a artrobactin, notadamente quelantes de ferro, e está estreitamente ligada à estrutura de aerobactin. Isso resulta de uma fração de ácido cítrico e duas moléculas de cadaverina. O grupamento apolar é composto por dois grupos ácidos de cadeia ramificada, R e R', variando de 6 a 10 átomos decarbono. Esses grupos ácidos podem substituir os grupos acetil encontrados em artrobactin e aerobactin, aumentando o comprimento da cadeia para 17 a 21 carbonos.



	R e R'		R"
Flavolipídios	$(CH_3)_2CH(CH_2)_nCH{=}CH$	(I) e/ou	
	$(CH_3)_2CH(CH_2)n\ CH_2CH$	(S) n = 0 até 4	
Artrobactin	CH_3		H
Aerobactin	CH_3		COOH

Figura 3.14 - Estrutura do flavolipídio e sua correlação com outros biossurfatantes (BODOUR *et al.*, 2004).

3.3 O gênero *Flavobacterium*

Flavobacterium é uma bactéria Gram-negativa, em forma de bastonetes finos, de 0,3 a 0,5 µm por 2 a 5 µm. Sob certas condições nutricionais podem formar filamentos de células (10 a 40 µm). As espécies desse gênero são aeróbias estritas ou facultativas, e se movimentam por deslizamento, excluindo *Flavobacterium branchiophilum*. Não apresentam flagelos. Algumas espécies desse gênero são patógenos oportunistas, podendo inclusive, infectar seres humanos (BERNADET *et* BOWMAN, 2006).

Muitos aspectos da fisiologia e bioquímica acerca do gênero estão por ser descobertos, pois, baseado em observações fenotípicas, o gênero se apresenta muito diverso metabolicamente. Entende-se por fenótipo as características herdáveis e observáveis. (BERNADET *et* BOWMAN, 2006).

Os membros do gênero *Flavobacterium* podem ser encontrados em uma diversidade de habitats e em diferentes condições ambientais. Ocorrem, geralmente, em ambientes aquáticos, tanto em água doce como salgada, porém, também podem ser isolados de solos naturais e impactados por diferentes contaminantes (BERNADET *et* BOWMAN, 2006).

Representantes desse gênero podem produzir, basicamente, dois tipos de pigmentos: carotenóides e/ou flexirubina (BERNADET *et* BOWMAN, 2006). A localização dos pigmentos é diferenciada: os carotenóides estão dispersos no citoplasma enquanto a flexirubina está presente na parte exterior da membrana celular. Os pigmentos geralmente não se difundem no meio. O conhecimento da natureza do pigmento pode ser útil, visto que os carotenóides usualmente são produzidos por membros marinhos, enquanto a flexirubina é associada as espécies com membros que habitam águas doces e solos. Uma mesma linhagem microbiana pode produzir ambos os pigmentos, sendo que algumas podem não produzí-lo (BERNADET *et* BOWMAN, 2006).

3.4 Funções biológicas dos biossurfatantes

Embora a exata função fisiológica dos biossurfatantes ainda não tenha sido completamente elucidada, sabe-se que exercem influência sobre a sobrevivência de micro-organismos por estarem relacionadas com (LANG, 2002; HAMME, SINGH *et* WARD, 2006):

- mobilidade – movimentação, deslizamento, ou ainda, desprendimento de superfícies;
- interações entre células – formação, manutenção e maturação de biofilme;
- patogênese;
- *quorum sensing* – mecanismo de comunicação entre células geralmente estimulada por mudanças ambientais e populacionais;
- amensalismo – ou seja, a inibição do crescimento de outras populações;
- acesso ao substrato – através do contato direto interfacial e pseudossolubilização.

A mobilidade celular é um processo essencial ao micro-organismo na busca por novos ambientes a serem colonizados para um contínuo crescimento e multiplicação da população. Um complexo mecanismo de detecção e sinalização permite que os micro-organismos desloquem-se em resposta aos fatores externos (luz, pH, potencial redox, nutrientes, substâncias tóxicas) e internos (força próton motora). Uma vez recebido o sinal e decifrado, o movimento pode ocorrer via rotação flagelar ou deslizamento, por meio de um movimento friccional da membrana protéica contra a superfície. Neste caso, se o micro-organismo estiver na interface, moléculas de biossurfatantes podem ser secretadas para reduzir a tensão interfacial e facilitar o movimento da colônia como uma unidade (HAMME, SINGH *et* WARD, 2006).

Como forma de assimilar hidrocarbonetos insolúveis em água e solos, alguns autores relacionam a produção de moléculas tensoativas como mecanismos de obtenção dos mesmos (LANG, 2002; HAMME, SINGH *et* WARD, 2006). O mecanismo pode consistir no contato direto das células com grandes gotículas de óleo, sem que haja emulsificação, ou pelo contato com pequenas gotículas de óleo, levando à emulsificação. No primeiro caso, o biossurfatante fica retido na porção externa da superfície celular, facilitando a ligação e o subsequente transporte do composto hidrofóbico para o interior da célula. No segundo caso, o micro-organismo pode ter acesso ao substrato pseudossolubilizado em micelas de

surfatantes ou emulsões.

Knickerbocker *et al.* (2000) relataram que a colonização de enxofre S^0 (insolúvel) se dá por meio da produção de fosfolipídios por *Acidithiobacillus thiooxidans,* onde, para esta espécie, as interações hidrofóbicas são importantes para a adesão celular nos grânulos de enxofre e posterior metabolização.

É possível que alguns biossurfatantes sejam, também, produzidos como moléculas de carbono para armazenamento externo, e não como agentes interfaciais. Por exemplo, HOMMEL *et al*. (1994) sugeriram que soforolipídios de *Candida albicans*, crescendo em glicose ou frutose, são produzidos para esta finalidade ou como uma adaptação à alta força osmótica.

Fatores de ordem econômica depõem contra o emprego de surfatantes de origem biológica, visto que seu custo de produção ainda não é vantajoso frente aos seus concorrentes químicos (HOLMBERG, 2001). Makkar *et* Cameotra (1999) estimaram que 50% do preço do bioproduto advém do meio fermentativo. Em face dessa problemática, busca-se a diminuição do custo de produção dos mesmos utilizando substratos orgânicos alternativos como os resíduos agroindustriais e industriais.

3.5 Insumos de baixo custo

3.5.1 Óleo de soja

Segundo a Resolução RDC nº 253, de 15 de setembro de 2005 (ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária), definem-se óleos vegetais e gorduras como os produtos constituídos, principalmente, de glicerídios de ácidos graxos de espécie(s) vegetal(ais). Também podem conter pequenas quantidades de outros lipídios como fosfolipídios, constituintes insaponificáveis e ácidos graxos livres naturalmente presentes no óleo ou na gordura. Os óleos vegetais se apresentam na forma líquida à temperatura de 25ºC e as gorduras vegetais se apresentam na forma sólida ou pastosa à temperatura de 25ºC.

Os óleos vegetais constituem um dos mais importantes derivados das plantas, com uma produção nacional da ordem de 6 milhões de toneladas no ano de 2008. Cerca de dois terços desta produção é usada em produtos alimentícios, sobretudo fritura de alimentos. Estes óleos também fazem parte da dieta humana, onde mais de 90% dos óleos produzidos são de origem vegetal, usados em comidas e em produtos industrializados comestíveis.

Na figura 3.15 é possível observar o incremento na produção de óleo de soja, bem

como o aumento crescente do consumo interno.

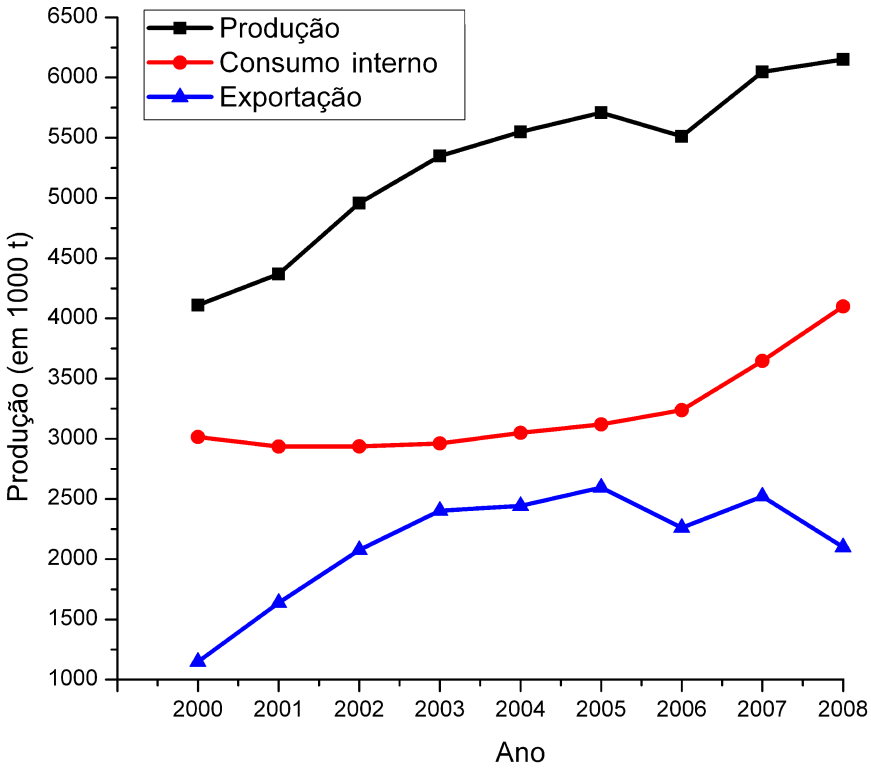


Figura 3.15 - Produção, consumo interno e exportação de óleo de soja. Fonte dos dados ABIOVE (www.abiove.com.br).

Em 2008, o governo brasileiro decidiu aumentar a mistura obrigatória de biodiesel ao diesel comum, e o setor de insumos pode sentir o impacto de tal decisão, pois cerca de 80% do biodiesel brasileiro é produzido a partir de óleo de soja. Como reflexo, observa-se no mesmo ano uma diminuição na exportação do produto, face à necessidade de atender a demanda interna da matéria-prima (www.biodieselbr.com).

A fritura por imersão é provavelmente um dos processos mais dinâmicos no que tange a transformação dos alimentos. Essencialmente, o processo envolve a imersão do alimento no óleo quente, que é, normalmente, reaproveitado ou completado por diversas vezes com óleo novo, antes da sua disposição final.

A maioria dos processos de fritura ocorre em temperaturas entre 175-195 ºC. Já os produtos extrusados geralmente são fritos a 190-215 ºC. Essas altas temperaturas e a presença de ar na mistura iniciam uma série de modificações químicas e físicas no óleo utilizado, resultado da decomposição dos constituintes neles presentes (SANIBAL *et*

MANCINI FILHO, 2004; ALADEDUNYE *et* PRZYBYLSKI, 2009).

Sanibal *et* Mancini Filho (2004) estudaram as transformações químicas dos constituintes do óleo de soja (Tabela 3.3) por ciclos de 5 horas diárias de aquecimento em fritadeira elétrica à temperatura controlada de 180°C ± 5°C por 10 dias, totalizando um período de fritura de 50 horas. A cada hora foram realizadas duas frituras de batatas palito pré-fritas congeladas. Analisando a tabela pode-se observar uma redução expressiva da porcentagem de ácidos graxos poli-insaturados, bem como um incremento da porcentagem de ácidos graxos monoinsaturados *trans*.

Tabela 3.3 - Composição percentual de ácidos graxos de óleo de soja em diversos tempos de utilização no processo de fritura por imersão de batata palito.

Ácidos graxos	Tempo de fritura (horas)					
	0	10	20	30	40	50
Não identificados	0,07	0,22	0,27	0,37	0,24	0,40
Total saturados	15,24	17,38	18,94	21,01	22,59	23,26
Total monoins.	22,69	23,89	24,75	25,95	26,67	26,64
Total polins	59,90	52,95	46,61	40,45	35,54	32,58
Total mono trans	0,00	2,10	6,35	9,11	11,99	14,27
Total poli trans	2,10	3,26	3,08	3,11	2,97	2,85

Fonte: SANIBAL *et* MANCINI FILHO, 2004.

Costa, Nitschke *et* Contieiro (2008) observaram diferenças nas propriedades de ramnolipídios produzidos por duas cepas diferentes do gênero *Pseudomonas* (LMI 6c e LMI 7a), isoladas de solos de aterros pertencentes a indústrias de óleos, abatedouros de aves e postos de gasolina. Esses isolados foram crescidos utilizando quatro diferentes substratos insolúveis (óleo de soja usado, borra de soja, gordura de frango e gordura vegetal) como fonte de carbono. Essas diferenças podem estar associadas a diferenças na composição dos óleos e na atividade de algumas enzimas bacterianas, como lipases (SHABTAI *et* DAYA-MISHNE, 1992).

3.5.2 Levedura residual cervejeira

As células ativas da levedura *Saccharomyces* são utilizadas de diferentes formas na indústria, sobretudo na panificação e fermentação alcoólica. Na forma inativa, comumente

tem sido utilizada como alimento na ração animal como fonte de proteínas e outros nutrientes. Na alimentação humana são utilizadas principalmente na forma de derivados, como complemento nutritivo, aromatizante e realçador de sabor (YAMADA *et al.*, 2003).

A espécie *Saccharomyces cerevisae* utilizada como agente de fermentação (pães, cerveja, álcool etílico) é produzida de tal forma, que os processos são bem controlados e exibem alto grau de pureza (YAMADA *et al.*, 2003).

Nas destilarias de álcool (etanol) e nas cervejarias, ao final do processo de fermentação, as leveduras são separadas do mosto fermentado e reutilizadas como inóculo em nova fermentação. O reaproveitamento das células é feito no máximo cinco vezes, por causa de redução da viabilidade celular e do nível de contaminação. Quando as células não podem ser mais reaproveitadas, são normalmente tratadas termicamente, e usadas diretamente (células íntegras) ou processadas para obtenção de derivados (YAMADA *et al*., 2003). Note-se ainda que ocorre crescimento celular durante o processo fermentativo, o que gera excedentes de células de levedura.

Além de apresentar elevado teor de proteína (30% a 70%), os produtos de levedura são ricos em vitaminas do complexo B (B1, B2, B6, ácido pantotênico, niacina, ácido fólico e biotina), e sais minerais, sendo os micro e macro elementos, particularmente selênio e fibra dietética (YAMADA *et al.*, 2003).

3.6 Fatores que influenciam na produção de biossurfatante

Nos processos produtivos industriais a palavra-chave é eficiência. Por eficiência entende-se maior quantidade produzida com o menor tempo. Nos bioprocessos, maiores produtividades podem ser alcançadas pelo emprego de: linhagens mais adaptadas (indução de mutação, engenharia genética, isolamento de cepas novas, seleção direcional); meios de cultivo e condições ambientais (fatores abióticos) mais adequados (pH, temperatura, agitação e aeração). Por outro lado, para a diminuição de custos busca-se, *a priori*, insumos de menor custo, principalmente das fontes de carbono e nitrogênio, visto serem utilizadas em maiores quantidades (DESAI *et* BANAT, 1997; MUKHERJEE, DAS *et* SEN, 2006; AMÉZCUA-VEGA *et al*., 2007; SINGH, HAMME *et* WARD, 2007).

Pelo fato de uma gama de micro-organismos sintetizarem biossurfatantes a partir de diferentes substratos como fonte de carbono, por exemplo, açúcares, óleos vegetais, resíduos agroindustriais, alcanos, entre outros, fazem-se necessários estudos específicos para cada substrato/linhagem visando sua otimização (SINGH, HAMME *et* WARD, 2007).

A literatura aponta para uma diversidade de fontes de carbono e nitrogênio que foram empregadas na produção de biossurfatantes por diferentes espécies de micro-organismos. A seguir são descritos alguns resultados publicados que corroboram as diferenças supracitadas, e como a composição do meio interferiu na síntese dos bioprodutos.

Thaniyavarn *et al.* (2006) obtiveram diferenças significativas de rendimento para a produção de ramnolipídios pela linhagem *Pseudomonas aeruginosa* A41 a partir de diferentes fontes de carbono (2% v/v): azeite de oliva, óleo de palmeira, óleo de coco, ácido lauríco, ácido miriástico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oléico e ácido linoleico. A maior concentração do bioproduto, 6,58 g/L, foi obtida pelo cultivo em azeite de oliva. No entanto, para o óleo de coco e o de palmeira foram produzidos apenas 2,9 g/L de ramnolipídios. Segundo os autores, apesar do menor rendimento, o óleo de palmeira é mais vantajoso do ponto de vista econômico e da sua disponibilidade, visto ser no sudeste asiático uma fonte abundante e de baixo custo.

Haba *et al.* (2000) obtiveram produções similares de ramnolipídios, de 2,7 g/L, a partir dos óleos residuais de fritura de azeite de oliva e de óleo de girassol, embora com propriedades (determinadas pela técnica de deslocamento do óleo) diferenciadas em função do tamanho dos ácidos graxos (C12>C14>C16) e do grau de saturação (C18:2>C18:1) do óleo. Lima *et al.* (2009), trabalhando com outra linhagem de *Pseudomonas aeruginosa*, obtiveram maiores concentrações de ramnolipídios (3,3 g/L), utilizando óleo de soja residual da fritura de alimentos como fonte de carbono; embora, como salientado pelos autores, a otimização da aeração e agitação tenham sido fundamentais para o aumento do rendimento.

Reis, Sérvulo *et* França (2004) estudaram o efeito de diferentes fontes de carbono (20 g/L) - açúcar cristal, caldo de cana, vinhoto, glicerol, manitol e óleo de soja - no crescimento celular e na modificação da tensão superficial do meio de cultura por *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Todas as fontes de carbono testadas foram favoráveis ao crescimento e produção de biossurfatante, embora os valores máximos tenham sido obtidos para o açúcar cristal. O melaço favoreceu o crescimento celular em detrimento da produção de biossurfatante, provavelmente pelo fato do subproduto da indústria açucareira conter alguns elementos (sais e aminoácidos) que favorecem o crescimento celular. Segundo os autores, a produção de biossurfatante e o crescimento celular não foram influenciados pelo pH inicial do meio na faixa de 5,5 a 8,5.

Santa Anna *et al.* (2002), variaram a fonte de nitrogênio (nitrato de sódio, sulfato de amônio e ureia) e a relação C/N, obtendo valor máximo de 3,16 g/L de ramnolípidio para *P. aeruginosa* PA1 crescida em nitrado de sódio, na relação C/N 60.

Ilori, Amobi *et* Odocha (2005), estudando os fatores que afetam a produção de biossurfatante por *Aeromonas* sp. evidenciaram produção mais rápida de glicolipídio a partir de grãos de soja como fonte de nitrogênio do que utilizando nitrato de amônio, de 2 e 6 dias, respectivamente. A adição de NaCl (0,5 a 20% p/v) também estimulou a produção, sendo obtido o máximo de produção com 5%.

Na Tabela 3.4 estão relacionadas algumas vantagens do emprego de diferentes matérias-primas, inclusive resíduos agroindustriais, nos processos produtivos (MAKKAR *et* CAMEOTRA, 1999).

Tabela 3.4 – Vantagens e desvantagens da utilização de substratos de baixo custo para a produção de biossurfatantes.

Fonte de carbono	Vantagem	Desvantagem
Carboidratos	Abundante na maioria das regiões de agronegócios (agricultura, silvicultura) Baixo custo dos resíduos	Baixas conversões de todo o substrato na produção de biosurfatantes lipídicos
Hidrocarbonetos	Abundante em algumas regiões com fontes de petróleo Altos rendimentos na produção de glicolipídios quando fornecido carboidratos	Custo de produção do biossurfatante atrelado ao preço do petróleo (quando não é resíduo) Utilização de resíduos de hidrocarbonetos ainda pouco estudado
Triglicerídios, ácidos graxos, óleos vegetais e gordura animal	Abundante em algumas regiões de agronegócios (agricultura, silvicultura, suinocultura, avicultura) Altos rendimentos na produção de glicolipídios quando fornecido carboidratos	Custo de produção do biossurfatante atrelado ao preço de óleos vegetais não residuais e ao preço das gorduras animais

Fonte: MAKKAR *et* CAMEOTRA, 1999.

3.7 Aplicação dos biossurfatantes

Os biossurfatantes, diferentemente dos surfatantes sintéticos, apresentam propriedades de ação específica, e maior tolerância no que tange às condições ambientais (pH, força iônica, temperatura, etc) (BOGNOLO, 1999), o que contribui para seu uso preferencial em aplicações mais nobres (SINGH, HAMME *et* WARD, 2007). Na Tabela 3.5 foram compiladas algumas possíveis aplicações industriais dos biossurfatantes.

Tabela 3.5 - Diferentes aplicações dos biossurfatantes químicos e forma de atuação.

Indústria	Aplicação	Papel do surfatante
Petróleo	Recuperação de óleo e de-emulsificação	Incremento da recuperação de óleo; estimulação da liberação do óleo em capilares; molhamento de superfícies sólidas; diminuição da tensão superficial e interfacial; solubilização de óleo.
		De-emulsificação de emulsões de óleo, redução da viscosidade, agente tensoativo
Ambiental	Biorremediação	Solubilização e incremento da degradação de hidrocarbonetos; remoção de metais pesados;
Alimentar	Emulsificação e de-elmusificação	Emulsificação; de-emulsificação; espumante; antiespulmante; agente lubrificante
Estudos Biológico	Microbiologia	Comportamento e fisiologia celular; comunicação celular; acesso a nutrientes; amensalismo; antibióticos (bactérias e fungos), agente antiviral, agente adesivo;
Bioprocesso	Processos "Downstreaming"	Biocatálise em ambientes de duas fases, recuepração de produtos intracelulares; incremento na produção de enzimas extracelulares
Cosmético	Saúde e produtos de beleza	Emulsificante; agente espumante; agente antimicrobiano; mediador de ação enzimática
Mineração	Tratamento de efluentes	Utilização como sequestrante de metal pesado em sistema de flotação
Química	Síntese	Síntese de nano tubos;
	Analítica	Criação de ambientes favoráveis a catálise de reações

Fonte: ZOBOULIS *et al.*,2003; SINGH, HAMME *et* WARD, 2007; PALANISAMY, 2008.

O emprego de biossurfatantes na biorremediação é realizado, basicamente, para auxiliar na remoção de compostos insolúveis, ou seja, compostos apolares e na remoção ou quelação de metais pesados. Urum *et* Pekdemir (2004), trabalhando com diferentes biossurfatantes (aescina, lecitina, ramnolipídio, saponina e tanino), obtiveram como melhor removedor de óleo cru em solo o tanino, retirando cerca de 60% da contaminação inicial de 87,5 mg/kg do referido óleo. Para tal descontaminação foi utilizado uma solução 0,004% de tanino em água.

Desai *et* Banat (1997) verificaram que a adição de emulsan ao Boscan (óleo cru pesado venezuelano) resultou num efetivo decréscimo de sua viscosidade, de um valor de 200.000 cP para 100 cP. Após a aplicação do biossurfatante foi possível transportar o óleo através de oleoduto comercial por 26.000 milhas. Uma outra aplicação relacionada com a indústria do petróleo está na limpeza de reservatórios de óleo. Resíduos e frações de óleos pesados que se depositam no fundo de tanques de estocagem são altamente viscosos e podem se tornar depósitos sólidos difíceis de serem removidos por bombeamento convencional. A remoção requer, normalmente, lavagens com solventes ou limpeza manual, ambas perigosas, demoradas e caras. Como alternativa na redução da viscosidade e formação de emulsão óleo/água, estuda-se a possibilidade do emprego de biossurfatantes para estas finalidades (BOGNOLO, 1999).

Já na remoção de metais, que não são passíveis de degradação, ou seja, transformação em outro composto menos tóxico, o tratamento é voltado para a concentração, como, por exemplo, a precipitação ou o sequestro e posterior disposição final de forma ambientalmente correta (SINGH *et* CAMEOTRA, 2004). Zouboulis *et al.* (2003) utilizaram surfactina e liquenisina (como sorvente ou adsorvente coloidal) na separação de Cr^{6+}, Zn^{2+} e Fe^{3+} de goetita através de métodos de flotação, ambos os biossurfatantes foram capazes de remover Cr^{6+} (50 mg/L) em pH 4. A surfactina se mostrou efetiva na remoção de Zn^{2+} (50 mg/L), enquanto a liquesina se mostrou ineficiente. Bodour *et al.* (2004) verificaram que os flavolipídios podem quelar Cd^{2+}, porém são mais eficientes para a complexação de Fe^{3+}, em virtude da formação de complexos mais estáveis. No mesmo estudo, a constante de estabilidade encontrada para o complexo Cd-flavolípídio (3,61) foi semelhante a de outras constantes de estabilidade determinadas para outros ligantes orgânicos como, por exemplo, ácido acético (1,2 a 3,2), ácido oxálico (4,1) e ácido cítrico (4,5).

Na química analítica, muitas das propriedades dos surfatantes são importantes, dentre elas, a formação de micelas, que oferecem interessantes perspectivas na área dos métodos cinéticos de análises, pois criam ambientes catalíticos (MANIASSO, 2001). Dentro

da química aplicada, Xie, Ye *et* Liu (2006) utilizaram ramnolipídios na síntese *in situ* de nanopartículas de prata, dentro de micelas reversas, ou seja, uma microemulsão de água em óleo. Os autores relatam que o diagrama de fase ramnolipídio/*n*-butanol/*n*-heptano/água é um sistema pseudoternário favorável à síntese de nanopartículas. Palanisamy (2008) também utilizou ramnolipídios na síntese de nanotubos de NiO.

Diversos biossurfatantes apresentam atividade antimicrobiana, permitindo o seu emprego também na indústria farmacêutica. Por exemplo, iturina, um lipopeptídeo produzido por linhagens de *B. subtilis*, apresenta atividade antifúngica, através do rompimento da membrana plasmática por formação de pequenas vesículas e agregados em partículas intramembranares (SINGH *et* CAMEOTRA, 2004). Os autores relatam a surfactina como poderoso agente de terapia trombolítica, indicando o seu uso para o tratamento de doenças relacionadas com o pulmão, miocárdio e cérebro. Dentre as vantagens da utilização da surfactina, são citadas a redução dos efeitos colaterais (desordens causadas pela utilização de algum medicamento) e a possibilidade de administração por longos períodos.

As propriedades dos biossurfatantes também podem ser extremamente úteis na indústria alimentar. A ação combinada das características antiadesiva, emulsificadora e antimicrobiana de alguns biossurfatantes tem chamado atenção no que tange à aplicação em alimentos como agente de remoção de biofilme (NITSCKE *et* COSTA, 2007).

3.8 Planejamento experimental

Na pesquisa, busca-se, *a priori*, saber dentre as variáveis passiveis de estudos/observações, quais são aquelas que influenciam o sistema de forma mais proeminente, ou seja, que sua modificação acompanhe uma modificação no sistema (CALADO *et* MONTGOMERY, 2003). Segundo estes autores, o planejamento experimental é uma das técnicas estatísticas utilizadas para determinar as variáveis que exercem maior influência no desempenho do processo. Esta técnica, associada à análise de superfícies de resposta, fornecem informações seguras sobre o processo, diminuindo o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (RODRIGUES *et* IEMMA, 2005). Para se ter êxito no planejamento experimental, o experimentador deve arquitetar os ensaios de forma que eles sejam capazes de fornecer informações que resultem na objetividade científica (NETO, SCARMINIO *et* BRUNS, 2002).

Portanto, ainda citando Calado *et* Montgomery (2003), os pesquisadores podem determinar as variáveis que exercem maior influência no sistema, tendo como resultado:

1. redução da variação do processo e melhor concordância entre os valores nominais obtidos e os valores pretendidos;
2. redução do tempo de processo;
3. redução de custos relativos às operações realizadas;
4. melhoria no rendimento de processos.

O processo microbiano de síntese dos biossurfatantes é complexo, envolvendo diversas variáveis, portanto a análise e planejamento de experimentos são mais confiáveis para este fim.

As metodologias estatísticas, principalmente planejamentos experimentais (completo e fracionário), foram utilizadas por alguns autores em estudos com o propósito de definir as condições para a produção de diferentes bioprodutos, incluindo os biossurfatantes. A seguir, são descritos alguns destes estudos.

Valpuesta (2008) utilizou *Bacillus subtilis* isolado de sistema *Landfarming* para a produção de biossurfatante. Foi utilizado um planejamento experimental fatorial 3^2, para estudar as variáveis independentes relação carbono/nitrogênio (3, 9 ou 15) e agitação (50, 150 ou 250 rpm), que indicou como melhores condições: relação C/N de 3 e agitação de 250 rpm.

Pacheco (2008) realizou um planejamento experimental fatorial fracionado 2^{8-4} para a produção de biossurfatante por *Rhodococcus erythropolis,* variando: concentração de Glicerol (10, 20 ou 30 g/L), Nitrato de Sódio (1; 3,4 ou 5,8 g/L), Cloreto de Sódio (0, 1 ou 2g/L), Sulfato de Magnésio (0; 0,1 ou 0,2 g/L), Cloreto Férrico (0; 0,01 ou 0,02 g/L), Cloreto de Cálcio (0; 0,02 ou 0,04 g/L), Extrato de Levedura (0; 0,1 ou 0,2 g/L) e solução de elementos traços (0; 0,5 ou 1 mL/L), totalizando 16 experimentos acrescidos de 4 pontos centrais. Os fatores que influenciaram positivamente as variáveis e respectivos valores ideais foram: Glicerol (10 g/L), Nitrato de Sódio (1 g/L) e Extrato de Levedura (0,2 g/L).

Os trabalhos relacionados acima revelam a importância da utilização do planejamento de experimentos para objetivar a seleção de variavéis importantes no crescimento microbiano ou na produção do produto de interesse.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

A linhagem *Flavobacterium* sp. AU-1 utilizada neste trabalho foi previamente isolada de um solo impactado com hidrocarbonetos, no ano de 2002. A cultura foi identificada através de métodos de bioquímica clássica, no Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), sob coordenação da Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues.

A cultura, que apresenta coloração laranja característica de compostos do tipo carotenóides (BERNADET *et* BOWMAN, 2006), consta do acervo do Laboratório de Microbiologia Industrial da Escola de Química /UFRJ.

4.2 Manutenção das culturas e preparo de inóculo

A linhagem bacteriana foi mantida em Ágar Nutriente (glicose 5 g/L; peptona 5 g/L e extrato de lêvedo 3 g/L) sob refrigeração a cerca de 4ºC (cultura estoque), através de repiques mensais.

Para a preparação dos inóculos, a cultura estoque foi ativada e propagada em tubos contendo Ágar Nutriente inclinado, incubados em estufa bacteriana a cerca de 28ºC. Decorridas 48 horas de incubação, as células bacterianas foram suspensas em 10 mL de solução salina (0,9% NaCl) estéril, com auxílio de alça previamente esterillizada por aquecimento ao rubro, e, após homogeneização em vórtex, foi feita a contagem das células em câmara de Neubauer. A partir da determinação da concentração celular foi calculado o volume de suspensão celular de modo a padronizar a concentração inicial de células a ser empregada, como inóculo, nos ensaios de produção de biossurfatante.

O cultivo em gelose teve como finalidade obter uma massa concentrada de células isenta de constituintes do meio de cultura. Embora, seja prática comum em bioprocessos industriais o emprego de células previamente cultivadas em meios líquidos apropriados na inoculação do meio de produção. A concentração volumétrica de inóculo varia de 5 a 50%, porém comumente utiliza-se cerca de 10% v/v (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

4.3 Insumos

Atualmente, as indústrias estão principalmente focadas na redução dos custos de produção e na minimização dos efluentes e resíduos gerados. Assim, o uso de insumos de baixo custo e de grande disponibilidade no território nacional pode contribuir para tornar o bioprocesso economicamente viável, garantindo que o custo do bioproduto seja comparável ao dos produtos químicos comercialmente empregados com o mesmo fim.

Por exemplo, o açúcar cristal vem sendo utilizado como matéria-prima por diferentes indústrias brasileiras para produção microbiana de produtos de alto valor agregado, como por exemplo, ácido lático e ácido cítrico. Outra possibilidade é fazer uso de matérias-primas não convencionais, como os rejeitos industriais.

Neste estudo foram testados dois rejeitos que já estão sendo usados como matérias-primas em outros processos industriais, mas cuja quantidade gerada em nada impede a disposição para obtenção de produtos de maior valor agregado.

4.3.1 Óleo de soja residual (DF)

Óleo de soja residual, ora em diante denominado óleo de soja DF (de fritura) foi obtido em estabelecimento comercial (restaurante) localizado na Freguesia, bairro de Jacarepaguá – Rio de Janeiro, RJ, que utiliza apenas óleo da marca Soya®. O mesmo foi utilizado por um período de 6 dias, em máquina industrial de fritura por imersão, na preparação de diversos produtos alimentícios, como relatado pelo próprio dono do estabelecimento.

Foi recolhido um volume total de 5 L que, após acondicionamento em garrafas plásticas, foi estocado sob refrigeração em geladeira, a cerca de 4ºC, a fim de empregar o mesmo material em todos os ensaios, sem risco de que viesse a sofrer alteração da sua composição durante o período de estocagem.

As garrafas plásticas do tipo PET, utilizadas para a estocagem do óleo residual, foram previamente lavadas com água e detergente neutro, exaustivamente, enxaguadas com água destilada, rinçadas com pequeno volume de etanol para facilitar a secagem do seu interior, o que foi assegurado pela injeção de ar.

4.3.2 Óleo de soja IN

Foi utilizado o da mesma marca do óleo residual (item 4.3.1) para fins comparativos.

4.3.3 Açúcar cristal

Foi utilizado o da marca União.

4.3.4 Levedura residual cervejeira

Outro insumo empregado como fonte alternativa de nitrogênio, em alguns experimentos, foi a levedura inativada seca, gentilmente cedida pela AmBev (Companhia de Bebidas das Américas) onde a composição desse resíduo é apresentada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Composição básica do resíduo seco de *Saccharomyces cerevisae.*

Constituintes	**Concentração (g/kg)**
Umidade (máxima)	80
Proteína bruta (mínima)	400
Matéria fibrosa (máxima)	30
Matéria mineral (máxima)	80
Aflatoxinas	5×10^{-6}

4.3.5 Fertilizante salitre do Chile

Outra fonte alternativa de nitrogênio usada foi o fertilizante comercial da marca Vitaplan® - Salitre do Chile, é um produto natural extraído do deserto do Atacama, no Chile, rico em $NaNO_3$.

Esse produto é principalmente usado como adubo nitrogenado, visto que fornece nitrogênio e sódio, que é um elemento benéfico para o crescimento de várias culturas vegetais, aumentando a absorção de potássio, cálcio e magnésio, e ainda apresenta menor salinidade devido à ausência de cloro.

Segundo informações constantes no rótulo, o produto comercializado contém 15% de nitrogênio solúvel e 14% de óxido de potássio. Com o propósito de analisar outros constituintes presentes no salitre do Chile utilizado, que poderiam interferir na produção

microbiana de biossurfatante, foi realizada caracterização parcial por difração de raios-X (DRX), no Laboratório de Análises de Materiais do CETEM/MCT. O produto foi também analisado por absorção atômica para quantificação das concentrações totais presentes de cálcio e ferro.

4.4 Meios de cultura

As composições dos dois meios utilizados na condução dos experimentos estão descritas na Tabela 4.2. As formulações de ambos os meios tiveram como base o meio Mineral Salt Medium (MSM), o qual é normalmente indicado para a produção de biossurfatante por bactérias, em especial *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, até o momento, as espécies bacterianas mais estudadas com este propósito (DESAI *et* BANAT, 1997; VALPUESTA, 2008).

O meio MSM-1, comparativamente ao meio original (REIS, SÉRVULO *et* FRANÇA, 2004), não apresenta uma série de microssais em sua composição conforme proposto por Ramana *et* Karanth (1989). Esse meio foi acrescido de diferentes fontes de carbono dependendo do interesse do experimento.

A modificação do meio MSM-2 se deve principalmente a substituição da fonte de nitrogênio inorgânico, $NaNO_3$ P.A., por salitre do Chile ($NaNO_3$), que por ser um produto comercial apresenta menor custo.

Tabela 4.2 – Composição dos meios de cultura utilizados para a produção de biossurfatante por *Flavobacterium* sp.

Constituintes	**Concentração (g/L)**	
	MSM-1	**MSM-2**
$NaNO_3$	4,0	------
Salitre do Chile	------	4,4
KCl	0,1	------
KH_2PO_4	0,5	0,5
K_2HPO_4	1,0	1,0
$CaCl_2.2H_2O$	0,05	------
$MgSO_4.7H_2O$	0,5	------

Os meios constituídos de fonte de carbono solúvel, após o ajuste do pH para 7,3 com

solução 0,1 M de NaOH, foram esterilizados por autoclavação à pressão de 0,5 atm (110ºC) por 15 min., para evitar a caramelização do substrato. No caso dos meios formulados com as fontes de carbono insolúveis, foi feita a autoclavação do meio mineral a pressão de 1 atm (121ºC) por 15 min., sendo o substrato posteriormente adicionado.

De modo a garantir a esterilidade dos meios, antes do seu emprego, todos os meios foram incubados em estufa bacteriológica por 24 horas.

4.5 Condições operacionais

Os ensaios foram conduzidos em escala de bancada, em frascos Erlenmeyers de 500 mL de capacidade, contendo 100 mL do meio MSM-1 ou MSM-2, dependendo do objetivo do ensaio, assim como a fonte de carbono. Após inoculação com volume adequado da suspensão de células em água destilada (item 4.2), padronizado para uma concentração inicial de 10^5 células/mL no meio de produção, os cultivos foram incubados em mesa agitadora a 150 rpm e 30ºC por períodos de tempo de 24 a 72 horas, quando foram feitas as determinações analíticas

O monitoramento da síntese de biossurfatante foi realizado indiretamente através da determinação da tensão superficial do meio após fermentação, visto que na presença de compostos com propriedades tensoativas ocorre a redução do valor da tensão superficial da água e, por conseguinte, o valor da tensão superficial do meio (MULLIGAN, 2005).

A determinação da tensão superficial foi feita no mosto isento de células, com o intuito de evitar interferências. Para tanto, o meio fermentado foi previamente centrifugado 10.000g por 40 min. e temperatura de 4°C.

4.6 Pureza da cultura

O acompanhamento da morfologia microscópica é fundamental para garantir a pureza dos cultivos durante a manutenção da cultura, no preparo do inóculo e nos ensaios de produção de biossurfatante. Com esse propósito, antes de cada inoculação e ao final do período de incubação, amostras dos cultivos preparadas segundo a técnica de coloração de Gram (MADIGAM *et* MARTINKO, 2004) foram visualizadas em microscópio ótico (OLYMPUS modelo CH30).

No caso das culturas estoque, que foram cultivadas em meio sólido, foi ainda possível confirmar a sua pureza através de exames macroscópicos, posto que as espécies

de *Flavobacterium* se caracterizam pela produção de pigmento (BERNADET, NAKAGAWA *et* HOLMES, 2002).

4.7 Determinações analíticas

4.7.1 Concentração celular

A contagem de células foi feita em microscópio óptico com auxílio da câmara de Neubauer (KLINGEBERG, VORLOP *et* ANTRANIKIAN, 1990). Com esse fim, amostras dos cultivos foram adequadamente diluídas para permitir uma contagem total entre 200 e 300 células no volume de 1 mm^3 correspondente aos 25 quadrantes centrais da câmara.

4.7.2 Tensão superficial

A análise da tensão superficial foi usada para determinar qualitativamente a síntese biológica do composto tensoativo. A tensão superficial foi determinada pelo método Du Nouy (COOPER, ZAJIC *et* GERSON, 1979) usando tensiômetro SIGMA 70 System Unit (KSV Instruments Ltd). O equipamento é dotado de um anel de platina-iridium com 2,0 cm de diâmetro e 6,4 cm de altura, o qual é imerso no líquido a ser analisado, contido em um recipiente com 5,0 cm de diâmetro. As análises foram realizadas a 25ºC e em triplicata.

As medidas foram feitas nos meios antes e após fermentação, no segundo caso, sendo previamente centrifugados a 10.000 x g por 20 min a 4ºC para remoção das células.

4.7.3 Diluição micelar crítica (DMC)

A quantidade de biossurfatante produzido foi determinada, indiretamente, pela determinação da DMC (OLIVEIRA *et al.,* 2006). Para tanto, amostras do mosto fermentado centrifugado a 10.000 x g por 40 min. a 4°C, para remoção de células, foram diluídas 10 (DMC^{-1}) e 100 vezes (DMC-2), em água destilada, tendo sido determinado o valor de tensão superficial correspondente a cada diluição conforme descrito no item 4.7.2.

4.7.4. pH

As medições de pH foram feitas através de potenciômetro modelo DMPH-1 Digimed.

4.8 Experimentos

4.8.1 Efeito da fonte de carbono

Neste ensaio, a produção de biossurfatante pela linhagem isolada de *Flavobacterium* sp. AU-1 foi avaliada no meio MSM-1 para diferentes fontes de carbono (Tabela 4.3), com base nas características fisiológicas descritas por BERNADET *et* BOWMAN, 2006.

Tabela 4.3 – Fontes de carbono empregadas e respectivas concentrações no meio para produção de biossurfatante.

Fonte de carbono	Quantidade (em 1L)
Dextrose	10 g
Sacarose	10 g
Glicerol	10 mL
Óleo de soja IN*	10 mL
Óleo de soja DF**	10 mL
Querosene	10 mL

* *In natura*;** De fritura (procedente de estabelecimento comercial).

A avaliação foi feita considerando a variação da tensão superficial entre o meio antes da inoculação e o meio fermentado na 48ª hora de processo. Em geral, a tensão superficial do mosto fermentado é usada como parâmetro indicativo da capacidade de produção de composto com propriedade tensoativa por um dado micro-organismo em determinadas condições de cultivo, especialmente quando não é possível ser efetuada a quantificação ou separação do biossurfatante do mosto (OLIVEIRA *et al.,* 2006). A síntese de biossurfatante por *Flavobacterium* é um fato recente, por conseguinte, ainda não foi desenvolvida metodologia que possibilite a sua quantificação, quer por pesagem após recuperação, quer indiretamente pela análise de um dos constituintes da molécula, como é o caso do composto tensoativo (ramnolipídio) produzido por diferentes espécies de *Pseudomonas* (Lima *et al.*, 2007;2009).

4.8.2 Avaliação do crescimento e da síntese do biossurfatante em função do tempo

Ensaios foram realizados com o intuito de determinar o grau de interdependência entre a fonte de carbono e o tempo de processo na produção de biossurfatante por *Flavobacterium* sp. Para tanto, a bactéria foi cultivada no meio MSM-1 (Tabela 4.2) na presença de diferentes fontes de carbono: solúvel (açúcar cristal 10g/L) e insolúvel (óleo de soja IN ou DF 10mL/L) em água.

Nessa etapa, os experimentos foram realizados usando frascos de sacrifício (um frasco para cada amostragem), a fim de evitar que freqüentes retiradas de amostras, para realização das determinações quantitativas, pudessem alterar a relação volume de meio/volume de ar (*headspace*). A crescente redução do volume no decorrer do tempo, por causa das amostragens, implicaria em aumentos da concentração de O_2 dissolvido no meio de cultura. Portanto, não seria possível garantir a confiabilidade dos resultados que seriam comprometidos por mudanças das condições de cultivo.

Em diferentes tempos de processo (24, 48 e 72 horas), foram feitas as determinações de pH, crescimento celular e biossurfatante. Novamente, a síntese de biossurfatante foi avaliada pela variação da tensão superficial do meio.

4.9 Planejamento estatístico

Selecionadas as variáveis importantes do processo, é necessário avaliar quantitativamente as suas influências sobre a resposta de interesse, bem como suas possíveis interações, e por fim, segue-se com as análises dos próprios dados para a validação do modelo. A análise de variância univariável (ANOVA) considera que as observações sejam normal e independentemente distribuídas com a mesma variância para cada tratamento ao nível do fato. Essas suposições devem ser verificadas pela análise de resíduos. Para realizar essas verificações, alguns gráficos podem ser utilizados como, por exemplo, a distribuição normal dos resíduos. Resíduo é a diferença na resposta observada e a prevista pelo modelo (CALADO *et* MONTGOMERY, 2003).

O valor p é o menor nível de significância que levaria à rejeição da hipótese nula H_0 para os dados fornecidos, ou seja, o valor p é o menor valor de α em que os dados são significantes (CALADO *et* MONTGOMERY, 2003). Na Tabela 4.4 estão expostas as interpretações do valor p segundo Triola (1999), que foram adotadas para a interpretação dos resultados no decorrer do desenvolvimento do presente estudo.

Tabela 4.4 - Interpretações para os valores p obtidos nos testes de hipóteses

Valor p	Interpretação
inferior a 0,01	Elevada significância estatística Evidência muito forte contra a hipótese nula
entre 0,01 e 0,05	Estatisticamente significante Evidência adequada contra a hipótese nula
superior a 0,05	Evidência insuficiente contra a hipótese nula

No caso do presente estudo, buscou-se a seleção dos parâmetros em uma tentativa de melhorar o desempenho final, ou seja, uma maior redução da tensão superficial final.

4.9.1 Estudo da co-integração quali e quantitativa e seleção de diferentes fontes de nitrogênio

Com o propósito de obter resultados significativos e confiáveis, os experimentos foram conduzidos de acordo com método estatístico de planejamento de misturas para a seleção da fonte de nitrogênio (levedura residual cervejeira, ureia, nitrato de sódio e sulfato de amônio).

Mistura é a proporção entre os diferentes componentes que fazem parte do estudo. Quando se altera a quantidade de um componente, o(s) outro(s) componente(s) também se altera(m), conforme pode ser descrito na equação abaixo:

$$\sum_{i=1}^{q} x_i = x_1 + x_2 + \ldots + x_q = 1 \qquad (1)$$

Portanto, os componentes não são independentes uns dos outros e obedecem a soma das frações da mistura, de todos os componentes, que deve ser igual a 100% ou 1. Essa é a grande diferença dos planejamentos fatoriais, onde as variáveis (ou componentes) são independentes entre si.

O planejamento de misturas empregado foi do *Simplex-lattice* [4,3] onde q = 4 e m = 3. Tal planejamento caracteriza-se pela mistura de quatro componentes em 25 proporções específicas, compondo 25 pontos experimentais sobre o "*Simplex*", distribuídos simetricamente em pontos determinados. Tal planejamento experimental gera uma matriz

(25×4), cujos elementos são proporções dos componentes da mistura, representadas por massas de ureia, levedura residual cervejeira, sulfato de amônio e nitrato de sódio, adicionados de mais dois pontos centrais, totalizando 27 experimentos sumarizados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Composição em g/L das diferentes fontes de nitrogênio utilizadas.

Ensaio	Ureia	Levedura	Sulfato de Amônio	Nitrato de Sódio
1	1,4	----	----	----
2	----	10,3	----	----
3	----	----	3,1	----
4	----	----	----	4,0
5	0,5	6,9	----	----
6	0,5	----	2,1	----
7	0,5	----	----	2,6
8	----	3,4	2,1	----
9	----	3,4	----	2,6
10	----	----	1,0	2,6
11	1,0	3,4	----	----
12	1,0	----	1,0	----
13	1,0	----	----	1,3
14	----	6,9	1,0	----
15	----	6,9	----	1,3
16	----	----	2,1	1,3
17	0,5	3,4	1,0	----
18	0,5	3,4	----	1,3
19	0,5	----	1,0	1,3
20	----	3,4	1,0	1,3
21	0,9	1,3	0,4	0,5
22	0,2	6,4	0,4	0,5
23	0,2	1,3	1,9	0,5
24	0,2	1,3	0,4	2,5
25	0,3	2,5	0,8	1,0
26	0,3	2,5	0,8	1,0
27	0,3	2,5	0,8	1,0

Os experimentos foram realizados de forma totalmente aleatória com pontos centrais. As quantidades das porções unitárias foram definidas de modo a ter para cada uma a concentração de 0,65 g/L de nitrogênio no meio de cultura. Essa concentração corresponde à quantidade de nitrogênio no meio original (MSM) constituído de 4 g/L de nitrato de sódio (RAMANA *et* KARANTH,1989).

Simplex pode ser definido como um poliedro de *n* dimensões e *n* + 1 vértices, onde *n* é o número de componentes (ou variáveis). O *Simplex* obtido para um sistema de misturas de quatro componentes é representado por um tetraedro equilátero, no qual os vértices são ocupados por pontos que representam os componentes puros (pontos vermelhos), misturas entre dois componentes (pontos amarelos), mistura entre três componentes (pontos azuis) e mistura dos quatros componentes (ponto verde), conforme demonstrado a seguir na figura 4.1.

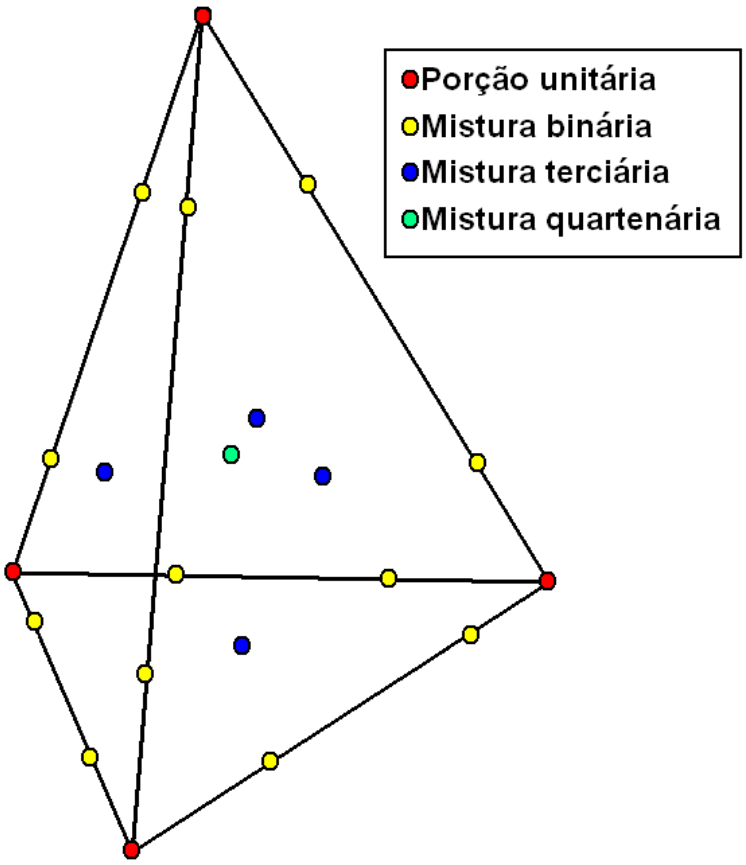


Figura 4.1 - Tetraedro representando os pontos de amostra do planejamento por mistura do tipo *Simplex-lattice* [4,3] e ponto central. Modificado de CALADO *et* MONTGOMERY, 2003.

No planejamento de misturas, usualmente são utilizados quatro modelos diferentes (equações 2 a 5):

Linear: $$y=\sum_{i=1}^{q}\beta_i x_i \quad (2)$$

Quadrático: $$y=\sum_{i=1}^{q}\beta_i x_i+\sum\sum_{i<j}^{q}\beta_{ij}x_i x_j \quad (3)$$

Cúbico:

$$y=\sum_{i=1}^{q}\beta_i x_i+\sum\sum_{i<j}^{q}\beta_{ij}x_i x_j+\sum\sum_{i<j}^{q}\delta_{ij}x_i x_j(x_i-x_j)+\sum\sum_{i<j<k}\sum\beta_{ijk}x_i x_j x_k \quad (4)$$

Cúbico especial: $$y=\sum_{i=1}^{q}\beta_i x_i+\sum\sum_{i<j}^{q}\beta_{ij}x_i x_j+\sum\sum_{i<j<k}\sum\beta_{ijk}x_i x_j x_k \quad (5)$$

Os parâmetros β_i representam as respostas esperadas para os componetes puros, o termo $\sum_{i=1}^{q}\beta_i x_i$ representa a porção linear da mistura (CALADO *et* MONTGOMERY, 2003).

Nessa etapa, a determinação da tensão superficial foi feita não só para amostras diretamente retiradas do mosto, mas também para amostras diluídas (1/10 e 1/100). Tal fato teve como propósito obter resultados que pudessem contribuir para estimar a quantidade produzida de biossurfatante. Como anteriormente mencionado, a determinação da tensão superficial é importante para definir a potencialidade de um micro-organismo em produzir biossurfatante. Contudo, esse parâmetro não permite avaliar a síntese em termos quantitativos, uma vez que atingido certo valor de tensão superficial não mais ocorre a sua redução, mesmo que o produto continue a ser produzido (BEHRING *et al.,* 2004). Por isso, foi também adotado como critério de análise, a determinação da diluição micelar crítica (DMC), que corresponde à tensão superficial do mosto previamente diluído como, por exemplo, a 10x (DMC^{-1}) e a 100x (DMC^{-2}).

4.9.2 Análise comparativa entre nitrato de sódio P.A. e fertilizante comercial (Salitre do Chile)

A substituição do reagente químico $NaNO_3$ (nitrato de sódio) P.A por um produto de natureza química semelhante e custo menor (fertilizante comercial Salitre do Chile - Vitaplan®), foi analisada estatísticamente. Para tanto, foi utilizado o teste *t* de *Student* para a comparação das médias, por meio de um teste de hipótese de comparação de médias. Nesse teste, são formuladas duas hipóteses, sendo definidas como hipótese nula, ou H_0, e hipótese alternativa, ou H_1, em que o objetivo é rejeitar a hipótese nula. No caso do teste t de *Student* para comparação de médias, a hipótese nula é:

$$H_0 : \bar{x}_{qui} = \bar{x}_{fertilizante}$$

e a hipótese alternativa é:

$$H_1 : \bar{x}_{qui} \neq \bar{x}_{fertilizante}$$

Onde: qui = químico

Se o valor p for maior que 0,05, então conclui-se que não há evidências para rejeitar H_0 e aceita-se as médias como sendo iguais.

Os experimentos foram realizados no meio MSM-2, com óleo de soja DF como fonte de carbono na concentração de 10mL/L. As quantidades utilizadas de nitrato de sódio e de fertilizante, calculadas de modo a reproduzir a concentração de nitrogênio no mosto de base (0,65 g/L), foram 4 g/L e 4,4 g/L, respectivamente. Na 24ª hora de processo, foi feita a determinação da diferença entre o valor da DMC^{-1} final e inicial, sendo os ensaios realizados em triplicata para cada tipo de fonte estudada.

4.9.3 Avaliação da melhor relação carbono (óleo de soja DF) e nitrogênio (fertilizante)

A proposta desse experimento foi estabelecer as melhores condições nutricionais face aos elementos de maior importância para o crescimento e a síntese de biossurfatante. Nos ensaios foram utilizados óleo de soja DF e fertilizante (salitre do Chile) com fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente.

4.9.3.1 Planejamento fatorial completo 2^k (k = 2) com ponto central

Um planejamento fatorial 2^k utiliza *k* fatores em dois níveis distintos. No presente estudo, foi utilizada como ferramenta para determinação da relação C/N, um planejamento fatorial 2^2, em que se variou a concentração de carbono e concentração de nitrogênio, acrescido de três réplicas no ponto central, totalizando sete experimentos.

Uma das preocupações que se tem em alguns modelos é a suposição de linearidade, como por exemplo nos modelos do tipo 2^k, em que k = número de variáveis. A inclusão de pontos centrais nesses tipos de planejamento, poderá indicar uma distorção do plano inclinado e a não linearidade do modelo, bem como permitirá uma estimativa independente do erro, pois as réplicas no ponto central não repercutem nas estimativas usuais dos efeitos (CALADO *et* MONTGOMERY, 2003).

Na Tabela 4.6 podem-se visualizar as concentrações de carbono e nitrogênio utilizadas neste planejamento 2^2 com pontos centrais.

Tabela 4.6 – Variáveis escalonadas utilizadas no planejamento.

Ensaio	Carbono (mL/L)	Nitrogênio (g/L)
1	10 (-1)	4,4 (-1)
2	100 (+1)	4,4 (-1)
3	10 (-1)	8,8 (+1)
4	100 (+1)	8,8 (+1)
PC	55 (0)	6,6 (0)

Para a realização da ANOVA, optou-se por trabalhar com as variáveis escalonadas. Seguem as fórmulas para o escalonamento:

$$x_i^- = \frac{X_i^- - \bar{X}_i}{\frac{X_i^+ - X_i^-}{2}} = -1 \quad \text{e} \quad x_i^+ = \frac{X_i^- - X_i}{\frac{X_i^+ - X_i^-}{2}} = -1 \qquad (6)$$

Os parâmetros de condução do processo foram os mesmos utilizados anteriormente, com a fonte de nitrogênio e fertilizante tendo as mesmas modificações realizadas como descrito no item 4.4.

4.10 Sumário cronológico

A Figura 4.2 sumariza em ordem cronológica os experimentos realizados.

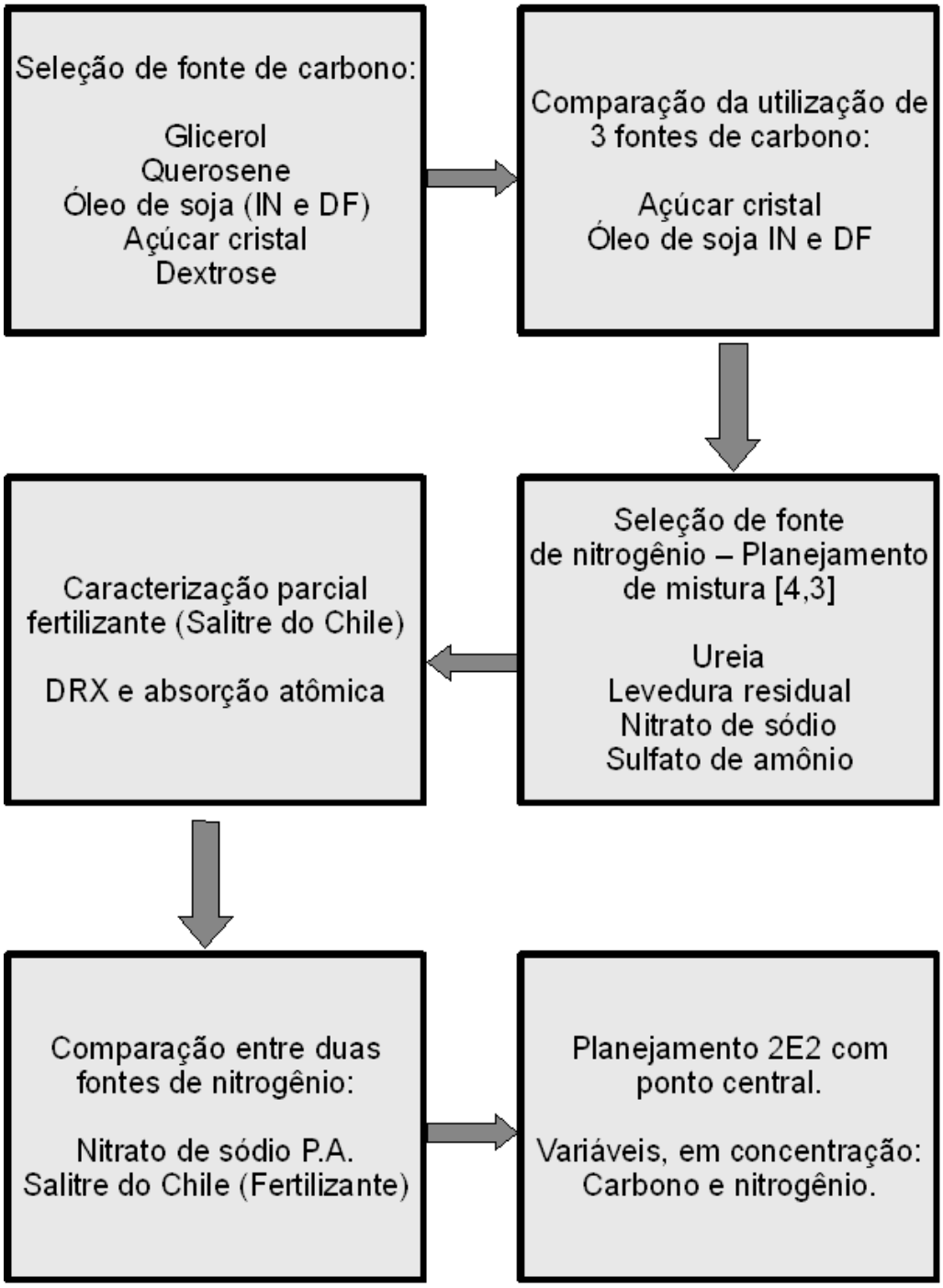


Figura 4.2 - Diagrama de quadros indicando a ordem de execução dos experimentos com base nos resultados preliminares.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Efeito da fonte de carbono

A Figura 5.1 apresenta a síntese de biossurfatante pela linhagem isolada *Flavobacterium* sp. AU-1 a partir de diferentes fontes de carbono. A seleção da fonte de carbono foi feita pela análise da tensão superficial no meio fermentado e da porcentagem de variação da tensão superficial após 48 horas de cultivo.

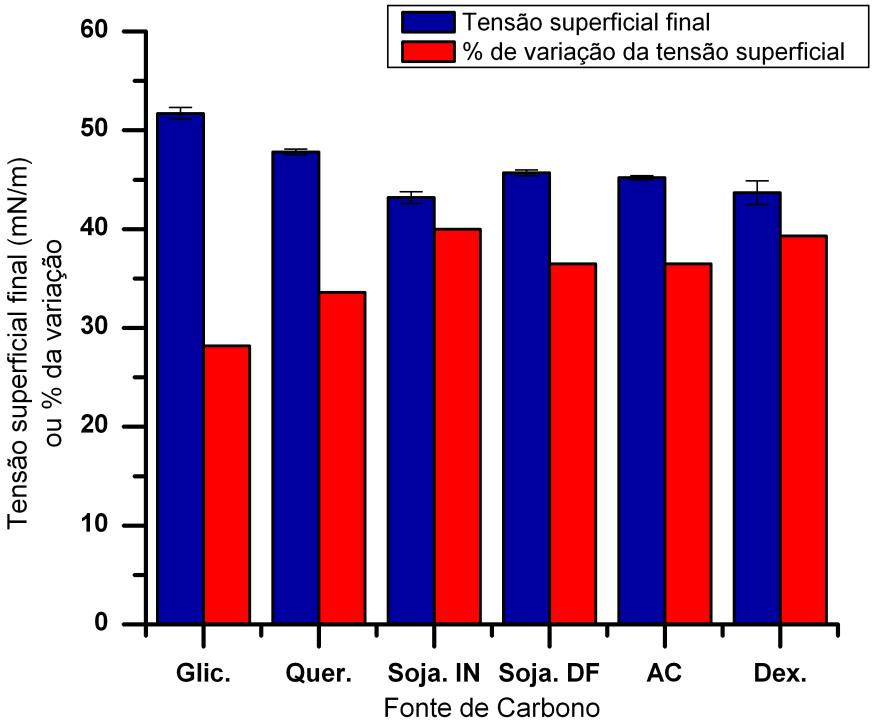


Figura 5.1 - Tensão superficial final (mN/m) e % da variação da tensão superficial utilizando seis diferentes fontes de carbono. GLIC - Glicerol; QUER - Querosene; Soja IN - Óleo de Soja in natura; Soja DF. - Óleo de Soja depois de frito; AC. - Açúcar Cristal comercial e Dex - Dextrose P.A.

Considerando que o aumento da quantidade de biossurfatante produzido ocasiona a redução do valor da tensão superficial, pode-se concluir que, à exceção dos meios formulados com glicerol e querosene, os demais foram mais favoráveis à síntese do composto tensoativo pela linhagem testada, independentemente da solubilidade da fonte de carbono em água. Além disso, as variações percentuais das tensões superficiais foram

máximas e similares para dextrose, açúcar cristal, óleo de soja *in natura* e óleo de soja residual DF. Cabe enfatizar que a composição básica dos constituintes dos meios utilizados, a exceção das fontes de carbono, foi a mesma, o que fez com que os valores de tensão superficial dos meios estéreis fossem os mesmos.

A estrutura do biossurfatante é dependente da espécie microbiana que o produz, e não necessariamente, as linhagens de uma mesma espécie microbiana são igualmente produtoras potenciais de biossurfatante. Destaca-se, ainda, que a maioria dos micro-organismos capazes de sintetizar biossurfatantes produz uma mistura de moléculas com propriedade tensoativa, sendo a natureza delas e suas proporções influenciadas pelas condições nutricionais e ambientais de cultivo. Em suma, de acordo com a linhagem e as condições de cultivo, os compostos tensoativos podem ser gerados em quantidades diferenciadas, como também podem ser estruturalmente diversificados, o que possibilita existirem os mais diversos tipos de compostos, com as mais diferentes características, permitindo o seu emprego em distintas aplicações (DESAI *et* BANAT, 1997; COSTA, NITSCHKE *et* PASTORE, 2008).

Segundo vários autores, a presença de biossurfatantes é fundamentalmente necessária para que os micro-organismos possam assimilar substratos insolúveis em água, como é o caso dos hidrocarbonetos (DESAI *et* BANAT, 1997; MULLIGAN, 2005; HAMME, SINGH *et* WARD, 2006). O transporte de compostos hidrofóbicos para dentro da célula, e seu subsequente consumo, em geral, requer a prévia formação de micelas. No entanto, existem alguns estudos que demonstram que os biossurfatantes também podem ser produzidos a partir de substratos solúveis em água, como glicose (DESAI *et* BANAT, 1997; MULLIGAN, 2005). Como exemplos, podem-se citar linhagens dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* produtores de ramnolipídios e lipopeptídios, respectivamente, cujos cultivos em substratos solúveis ou insolúveis ocasionam expressiva redução dos valores de tensão superficial, em ambos os casos (PRUTHI *et* CAMEOTRA, 1997; REIS, SÉRVULO *et* FRANÇA, 2004).

Experimentos conduzidos por Santa Anna *et al.* (2002) com a linhagem *Pseudomonas aeruginosa* PA1, indicaram produções máximas de ramnolipídio para óleo de babaçu e glicerol, quando foram alcançados valores de tensão superficial nos meios fermentados de 27,6 mN/m e 27,4 mN/m, respectivamente. Esses valores diferem pouco entre si, porém, a grande diferença das fontes citadas se deu pela concentração final do produto (200 mg/L para óleo de babaçu e 690 mg/L para glicerol). Estes resultados demonstram que a partir de um determinado valor, a tensão superficial não mais varia,

mesmo que a quantidade do biossurfatante seja incrementada.

Por outro lado, Abouseoud *et al.* (2008), cultivando uma outra linhagem do gênero *Pseudomonas, P. fluorescens* DSMZ 1985, evidenciaram produção de biossurfatante em *n*-hexadecano e azeite de oliva, mas não a partir de fonte solúvel de carbono (glicose), sugerindo a necessidade da presença da fonte insolúvel para induzir a produção do bioproduto. Nesse estudo, a melhor resposta foi obtida para azeite de oliva, sendo a tensão superficial do meio fermentado de 38 mN/m.

Os resultados obtidos neste estudo confirmam a possibilidade de bactérias do gênero *Flavobacterium* de sintetizar biossurfatantes, independente da solubilidade do substrato. Contudo, os valores de tensão superficial nos mostos fermentados, ao redor de 45 mN/m, não foram de todo satisfatório. Conforme citado por Mulligan (2005), um micro-organismo é considerado promissor, se produz composto tensoativo capaz de reduzir a tensão superficial do meio fermentado para valores próximos de 40 mN/m.

Em face da potencialidade dessa cultura microbiana em produzir compostos com propriedades tensoativas, foi dada continuidade ao estudo, com o intuito de definir a formulação de um meio de cultura com insumos de baixo custo que permitam incrementar a biossíntese do produto. Nesse contexto, foram selecionados: açúcar cristal e os óleos de soja IN e DF.

5.2 Avaliação do crescimento e síntese do biossurfatante em função do tempo

A Figura 5.2 apresenta os dados referentes a tensão superficial, em valores médios, em três diferentes tempos (24, 48 e 72 horas) para cultivos em meio MSM-1 com distintas fontes de carbono: açúcar cristal, óleo de soja IN (*in natura*) e óleo de soja residual (DF).

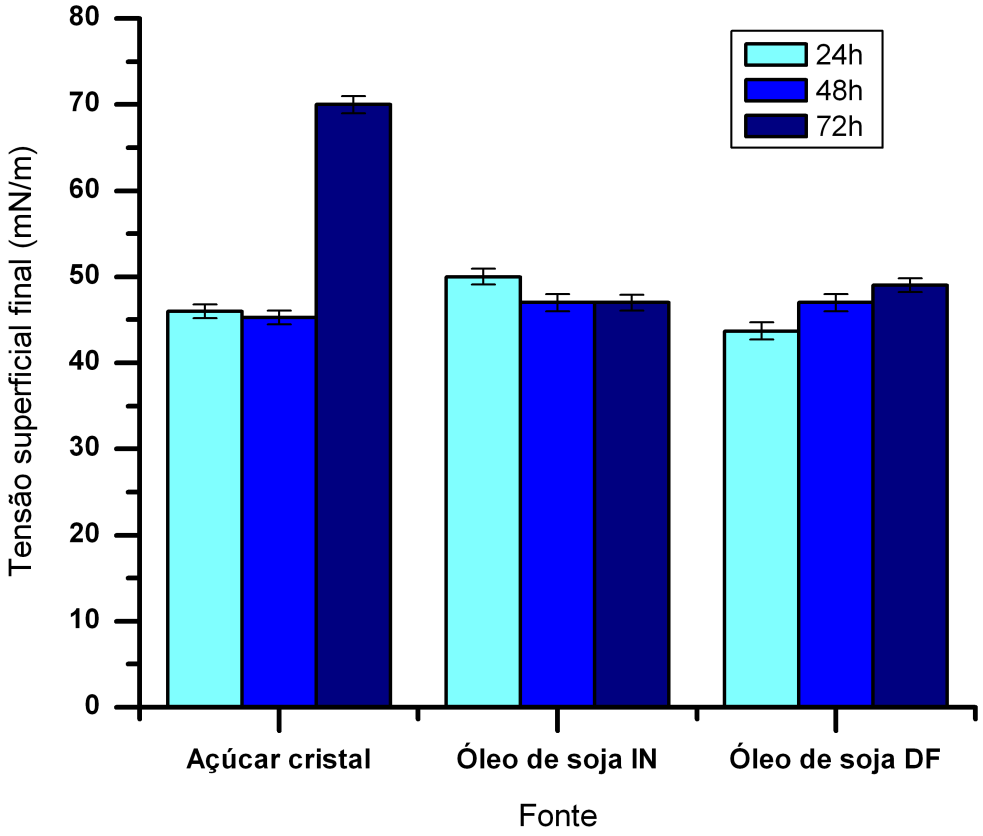


Figura 5.2 - Variação da tensão superficial em função da fonte de carbono e do tempo de processo.

Analisando a figura pode-se inferir que as três fontes de carbono estimularam similarmente à síntese do biossufatante pela bactéria em estudo. Contudo, aparentemente, o metabolismo microbiano variou em função da fonte de carbono empregada. No caso da fonte de carbono solúvel em água, houve um ligeiro aumento da tensão superficial ao final do processo, provavelmente em decorrência da degradação do tensoativo biológico e seu consumo. A metabolização do biossurfatante pode estar relacionada ao esgotamento da fonte de carbono principal (sacarose) e à utilização do bioproduto como fonte secundária de carbono, fenômeno conhecido como diauxia. Segundo Hogg (2005), o fenômeno diáuxico é representado pelo consumo preferencial de um substrato, geralmente o de maior valor

energético, seguindo-se o consumo de outro substrato por ventura também presente no meio, ou do produto gerado durante o metabolismo.

Davies, Lynch *et* Varley (1999), cultivando *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em meio constituído de 10 g/L de dextrose e 4 g/L de nitrato de amônio, observaram consumo total do substrato em 14 horas de processo. Isso demonstra a rápida metabolização de açúcares pelas espécies bacterianas.

No presente estudo, o emprego de fontes de carbono insolúveis em água (óleo de soja IN e DF) para a produção de biossurfatante por *Flavobacterium* AU-1 apresentou comportamento semelhante ao evidenciado para a fonte solúvel, visto que os valores mínimos de tensão superficial alcançados foram similares. No entanto, pelo emprego das fontes de carbono imiscíveis em água, pelo menos, durante o tempo de processo monitorado, não foi observada a degradação dos compostos tensoativos produzidos.

Segundo Koch *et al.* (1991), a maioria dos compostos com atividade tensoativa é produzida quando os micro-organismos são cultivados em meios contendo substratos de baixa solubilidade em água. Esses autores também observaram a perda da capacidade de uma linhagem mutante, *Pseudomonas aureaginosa* PG201, de crescer a custa de *n*-hexadecano como fonte de carbono, em virtude de não mais secretar ramnolipídios. Entretanto, a produção de biossurfatante por *Serratia marcescens* a partir de óleos vegetais foi atribuída à presença do ácido linoléico, cujo conteúdo corresponde à cerca de 60% do óleo de girassol (FERRAZ, ARAUJO *et* PASTORE, 2002).

Portanto, com base nos dados obtidos e nas informações levantadas, pode-se concluir que a capacidade de síntese de biossurfatante pela linhagem isolada independe da solubilidade do substrato em água. Nota-se, ainda, que a composição do óleo vegetal também não interferiu no processo, já que os valores finais de tensão superficial nos meios com óleo *in natura* e óleo de fritura, foram semelhantes se considerados os desvios (teste t de *Student*, $p>0,05$).

A composição dos óleos de fritura é afetada pela perda de ácidos graxos poli-insaturados. Os compostos constituintes dos óleos sofrem alterações, como resultado de reações de polimerização, oxidação e hidrólise (SANIBAL *et* MANCINI FILHO, 2004). As alterações que ocorrem em um óleo durante o processo de fritura derivam de reações hidrolíticas e oxidativas. A intensidade com que essas reações ocorrem depende de vários fatores, particularmente, temperatura e tempo de fritura, relação superfície/volume do óleo, tipo de aquecimento, tipo do óleo empregado, adição de óleo novo e natureza do alimento a ser frito. A degradação do óleo depende da maior ou menor presença de ácidos graxos

insaturados em sua composição. Óleos vegetais que possuem uma grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados estão mais sujeitos à oxidação do que óleos que possuem maior quantidade de ácidos graxos saturados (SANIBAL *et* MANCINI FILHO, 2004). O efeito da relação superfície/volume também é um fator importante a ser considerado no estudo da degradação que o óleo tende a sofrer durante a fritura. Quanto maior essa relação, maior a taxa de degradação do óleo. Isto acontece porque a superfície específica de óleo em contato com o ar está diretamente relacionada com o desenvolvimento das reações oxidativas (SANIBAL *et* MANCINI FILHO, 2004).

Nas condições do presente estudo, a produção de compostos tensoativos, independentemente da solubilidade, ocorreu em no máximo, 24 horas. Cabe salientar que o máximo de crescimento para as três fontes de carbono também foi determinado nas primeiras 24 horas, variando de $1,1 \times 10^8$ a $1,9 \times 10^8$ células/mL. Esses valores praticamente não variaram ao longo do processo; por isso, os dados não foram apresentados. O pH final de todos os cultivos, ao longo de todo o período ficou em torno da neutralidade, com valores variando de 7,01 até 7,20.

Em face dos resultados obtidos, o óleo de soja de fritura (DF) foi selecionado para a continuidade do trabalho, visto ser a redução de custos fundamental para tornar os biossurfatantes competitivos em relação aos surfatantes sintéticos que são mais comercializados. Entretanto, cabe enfatizar que a fonte de carbono interfere na estrutura do biossurfatante, bem como na quantidade produzida (DESAI *et* BANAT, 1997).

5.3 Estudo da co-integração quali e quantitativa de fontes de nitrogênio

Um planejamento experimental de misturas *Simplex-lattice* [4,3] com ponto central foi desenvolvido para avaliar a influência de diferentes fontes de nitrogênio, visando a produção de biossurfatante por *Flavobacterium* AU-1, a partir de óleo de soja de fritura (DF). Formulações do meio foram testadas com as seguintes fontes de nitrogênio: sulfato de amônio, nitrato de sódio, ureia e resíduo da indústria cervejeira (levedura).

A Tabela 5.1 apresenta as proporções, em porcentagem, de cada componente e as respostas obtidas para a diferença entre os valores de tensão superficial do meio estéril e do mosto fermentado ($\Delta TS = TS_{inicial} - TS_{Final}$) e apenas os valores de diluição micelar crítica, DMC^{-1}, já que a resposta para DMC^{-2} foram zero para todos os casos.

Tabela 5.1 – Componentes empregados (em %) em cada ensaio e as respostas obtidas.

Ensaio	Componentes em %				Respostas em Δ	
	Ureia	Levedura	$(NH_4)_2SO_4$	$NaNO_3$	TS	DMC^{-1}
1	1	0	0	0	30	18
2	0	1	0	0	0	0
3	0	0	1	0	22	0
4	0	0	0	1	27	16
5	0,33	0,67	0	0	0	2
6	0,33	0	0,67	0	22	0
7	0,33	0	0	0,67	27	16
8	0	0,33	0,67	0	0	4
9	0	0,33	0	0,67	0	3
10	0	0	0,33	0,67	26	12
11	0,67	0,33	0	0	0	4
12	0,67	0	0,33	0	26	14
13	0,67	0	0	0,33	26	16
14	0	0,67	0,33	0	0	4
15	0	0,67	0	0,33	0	4
16	0	0	0,67	0,33	22	4
17	0,33	0,33	0,33	0	0	1
18	0,33	0,33	0	0,33	0	3
19	0,33	0	0,33	0,33	25	0
20	0	0,33	0,33	0,33	0	1
21	0,625	0,125	0,125	0,125	0	2
22	0,125	0,625	0,125	0,125	0	2
23	0,125	0,125	0,625	0,125	0	6
24	0,125	0,125	0,125	0,625	0	5
25	0,250	0,250	0,250	0,250	0	3
26	0,250	0,250	0,250	0,250	0	4
27	0,250	0,250	0,250	0,250	0	2

A DMC (Diluição Micelar Crítica) indica indiretamente a quantidade de tensoativo biológico produzido, pois, quanto menor o valor da tensão superficial para a maior diluição,

maior a quantiade de biossurfatante. Logo, pode-se concluir que os ensaios de 1 e 4, correspondentes às composições unitárias (100%) de ureia e nitrato de sódio, respectivamente, bem como os ensaios 7 e 13, cujo meio era composto de 0,33% de ureia e 0,67% de nitrato de sódio e 0,67% de ureia e 0,33% de nitrato de sódio, respectivamente, foram as melhores condições nutricionais, uma vez que levaram aos maiores valores percentuais de ΔDMC^{-1}.

Em todos os ensaios realizados com levedura residual cervejeira como constituinte único ou parcial do meio, não houve variação de tensão superficial em relação aos respectivos meios estéreis. Isso é consequência da presença de *debris* celulares, que são partículas de células mortas, como parede celular e constituintes de membranas, que dada a sua natureza, apresentam moléculas anfipáticas. Esse fato também foi relatado por outros autores para meios constituídos de extrato de levedo ou levedura residual cervejeira (REIS, SÉRVULO *et* FRANÇA, 2004; VALPUESTA, 2008).

A análise estatística dos valores de tensão superficial, apresentados na Tabela 5.2, empregando o programa *Statistica* 7.0 (StatSoft) foi feita fundamentada no planejamento de mistura. Como o planejamento de mistura possibilita empregar 4 diferentes modelos, a analise estatística depende preliminarmente da escolha do modelo que melhor se adeque às respostas obtidas.

Avaliando os efeitos da mistura para as quatro fontes de nitrogênio para os valores de ΔDMC^{-1}, foi realizado uma Análise de Variância (ANOVA) para os modelos obtidos. A Tabela 5.2 expõe os valores obtidos na ANOVA.

Tabela 5.2 – Análise de variância para o ajuste de diferentes modelos à resposta ΔDMC^{-1}.

Modelo	SQef	GLef	MQef	SQerr	GLerr	MQerr	F	p	R^2
LN	422,20	3	140,73	422,32	23	18,36	7,66	0,0010	0,50
QD	224,39	6	37,40	197,92	17	11,64	3,21	0,0270	0,77
CB	53,10	6	8,85	89,90	7	12,84	0,69	0,6670	0,89
CBE	54,93	4	13,73	143,00	13	11,00	1,25	0,3390	0,83
Total Ajustado	844,52	26	32,48						

LN – Linear; QD – Quadrático; CB – Cúbico; CBE – Cúbico Especial. SQ – soma quadrática; GL – graus de liberdade; MQ – média quadrática; ef – efeitos; err – erro.

Os modelos linear (LN) e quadrático (QD) foram os que apresentaram significância estatística, de acordo com valor de p (<0,05). O valor do coeficiente de correlação (R^2) do

modelo quadrático de 0,77 indica que este modelo explica 77% da variabilidade encontrada. Apesar dos modelos cúbico (CB) e cúbico especial (CBE) apresentarem valores de R^2 um pouco maior que o modelo quadrático, eles não foram significativamente estatísticos (p>0,05). Portanto, o modelo quadrático foi escolhido para dar prosseguimento as análises estatísticas.

A seguir, o gráfico de Pareto para os termos do modelo quadrático (Figura 5.3).

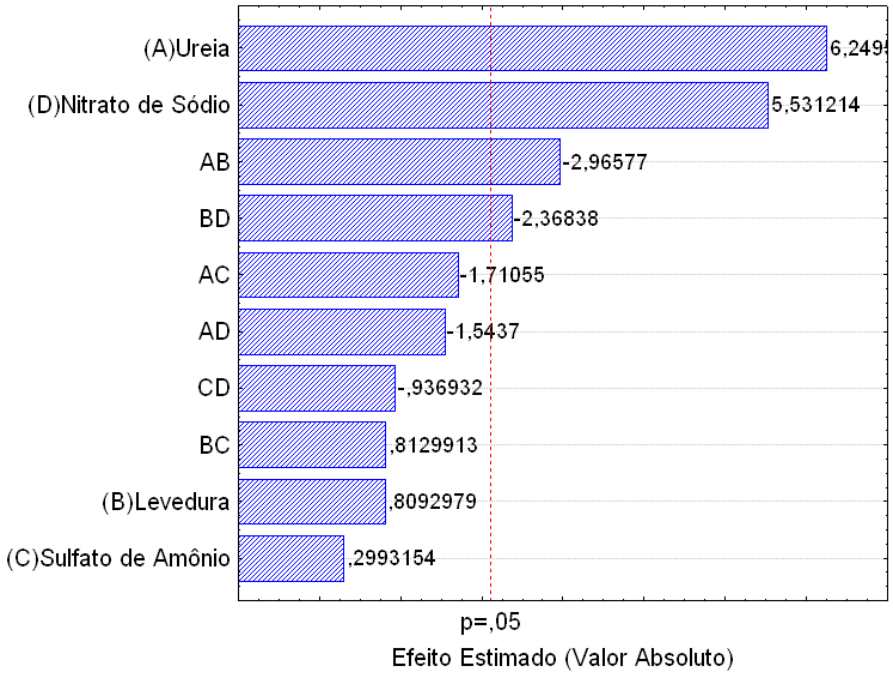


Figura 5.3 - Gráfico de Pareto para as variáveis do modelo quadrático do ΔDMC^{-1}.

Analisando o gráfico de Pareto apresentado na e Figura 5.3, verifica-se que a levedura residual cervejeira não favorece a produção de biossurfatante por *Flavobacterium* sp. AU-1. Amézcuea-Vega *et al*. (2007) também encontram resultado semelhante para a produção de biossurfatante por *Candida ingens*, onde, inclusive, estudaram a influencia das relações C/N (20 e 30 g/g), C/Fe (520 e 780 g/g), C/Mg (80 e 360 g/g), C/P (10 e 30 g/g) e extrato de levedura (0,01 e 1 g/g) através de um planejamento experimental 2^{5-1}. A partir da ANOVA, foram determinadas como variáveis mais significativas (p<0,05): C/P e C/Fe e as interações C/P-C/Fe, C/P-extrato de levedura e C/Fe-extrato de levedura. As interações com o extrato de levedura foram significativas, sendo que o mesmo não aconteceu com o efeito principal.

Na Figura 5.6 é mostrada a superfície de resposta de ΔDMC^{-1} para a mistura ternária de nitrato de sódio, ureia e sulfato de amônio, utilizando o modelo quadrático e a levedura no nível 0.

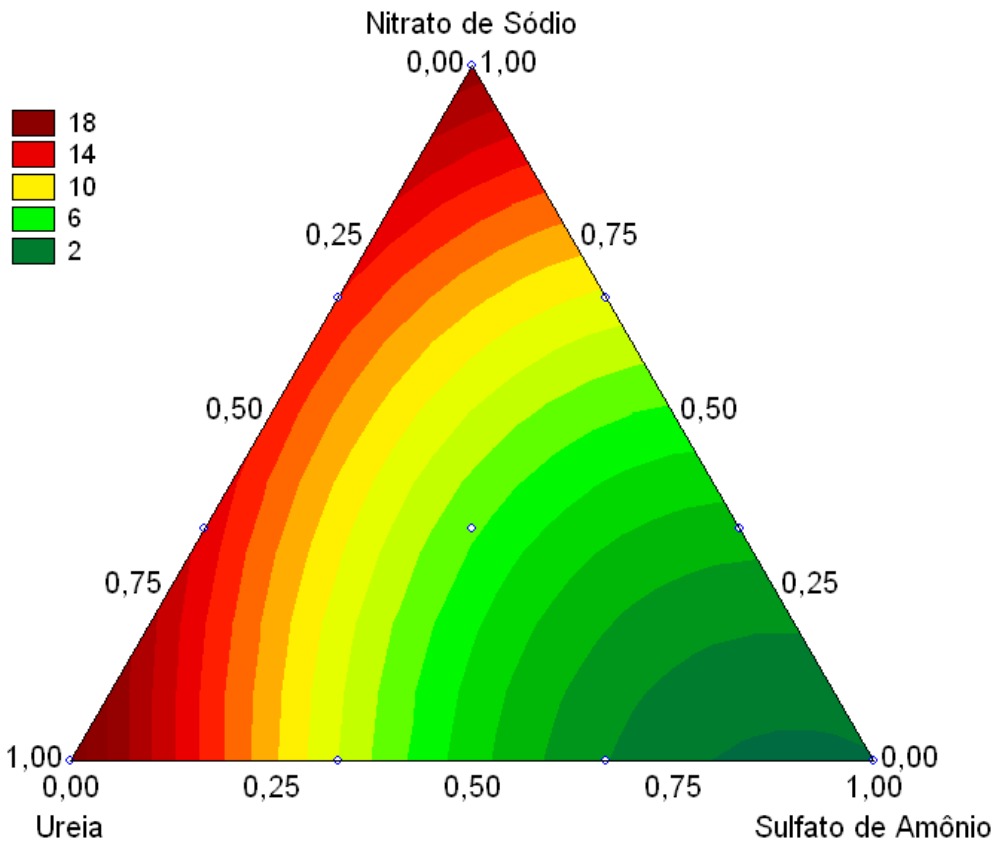


Figura 5.4 - Superfície de resposta para nitrato de sódio, ureia e sulfato de smônio. Modelo quadrático e nível da levedura igual a zero.

Observa-se que a ureia e o nitrato de sódio, combinados em várias proporções, mas em particular separadamente, são as melhores opções. Porém, para dar continuidade aos experimentos, optou-se pela utilização do nitrato de sódio isoladamente, pois a ureia apresenta um átomo de carbono em sua estrutura, que poderia concorrer como fonte de carbono, mascarando os resultados.

De acordo com Davies, Lynch *et* Varley (1999), o emprego do íon amônio como fonte de nitrogênio favoreceu o crescimento celular de *Bacillus subtilis* ATCC 21332, enquanto o íon nitrato foi consumido durante seu metabolismo secundário. Entende-se por metabolismo secundário as reações que ocorrem na célula, que não são fundamentalmente necessárias

ao crescimento celular. Santa Anna *et al.*(2002) obtiveram valor máximo de rendimento para a produção de ramnolipídio por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 a partir de glicerol como fonte de carbono e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, comparativamente à ureia e sulfato de amônio.

A Figura 5.5 apresenta o gráfico de distribuição normal dos resíduos para os valores obtidos para ΔDMC^{-1}. A distribuição dos resíduos, em alguns pontos, se afasta da linha de distribuição normal, indicando um modelo menos adequado. Porém, segundo Neto, Scarminio *et* Bruns (1999), dependendo dos erros que estamos dispostos a tolerar nas previsões feitas a partir da equação de regressão, pode ser que a falta de ajuste do modelo, bem como da heteroscedasticidade das respostas, ou seja, a dispersão dos pontos em torno da reta, não tenha qualquer importância prática. Portanto, o que se propôs ao realizar o planejamento de mistura para decidir por uma fonte de nitrogênio ou de uma mistura, o modelo, apesar de fraco, satisfaz no auxílio da tomada de decisão.

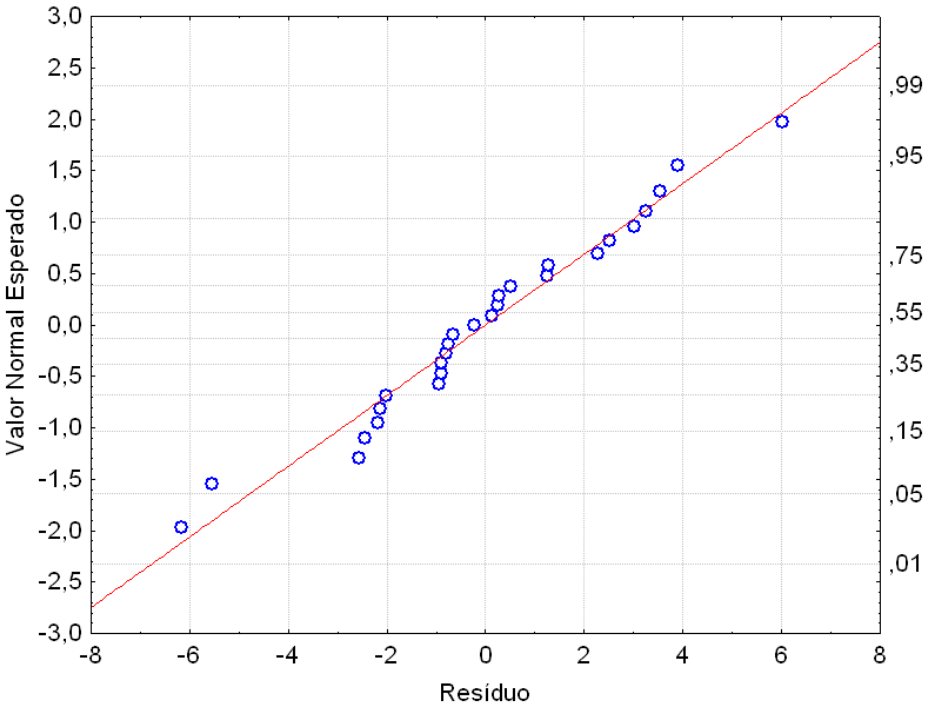


Figura 5.5 - Gráfico da distribuição normal dos resíduos para ΔDMC^{-1}.

5.4 Caracterização parcial do fertilizante salitre do Chile

De acordo com as interpretações qualitativas do espectro de Difração de Raio-X, efetuadas por comparação com padrões do banco de dados PDF02, por meio do *software* Bruker Diffrac^{Plus}, foi detectada, principalmente, a presença de Nitratina (KNO_3), Dolomita ($CaMg(CO_3)_2$), e Ilmenita ($FeTiO_2$).

A análise posterior do fertilizante por absorção atômica com chama de acetileno indicou ainda concentrações de Ca e Fe, de 770 e 176 mg/Kg, respectivamente.

Baseado nestes dados, o fertilizante comercial se apresenta como uma possível alternativa como fonte de nitrogênio, além do seu conteúdo em cálcio e magnésio, elementos importantes para a atividade metabólica dos micro-organismos. O ferro também é um elemento de interesse, principalmente como co-fator dos citocromos, enzimas envolvidas na respiração celular. Porém, no fertilizante, o ferro presente não está em uma forma prontamente assimilável.

5.5 Análise comparativa entre nitrato de sódio P.A. e fertilizante comercial (salitre do Chile)

Considerando os dados obtidos na caracterização parcial do fertilizante salitre do Chile, foi dado prosseguimento ao estudo, para avaliar a possibilidade do uso do produto comercial, de baixo custo, em substituição ao nitrato de sódio. Ainda, com base nas informações obtidas quanto à presença de cálcio e magnésio no produto comercial, o meio constituído de 10g/L de óleo de soja DF não foi suplementado com esses elementos.

O emprego do programa computacional *Statistica* 7.0 (StatSoft) permitiu o levantamento dos dados apresentados na Tabela 5.3, como resultado do teste t de *Student*.

Tabela 5.3 - Resultados do teste t de *Student* para a comparação das médias.

	Média QUI (DP)	Média SC (DP)	valor-t	GL	p
QUI vs. SC	22,7 (1,1)	21,6 (1,2)	0,8660	2	0,4777

QUI – Nitrato de sódio - Reagente químico grau P.A.
SC – Fertilizante - Salitre do Chile marca Vitaplan®.
GL – Graus de liberdade.

Na Tabela 5.4, observa-se que o valor de p é de 0,4770, ou seja, maior do que 0,05,

o que indica que não se tem evidências suficientes para rejeitar H_0 (hipótese nula), e que, portanto, as médias são estatisticamente iguais. Uma forma gráfica de visualizar essa tabela é através do gráfico Box & Whisker (Figura 5.6).

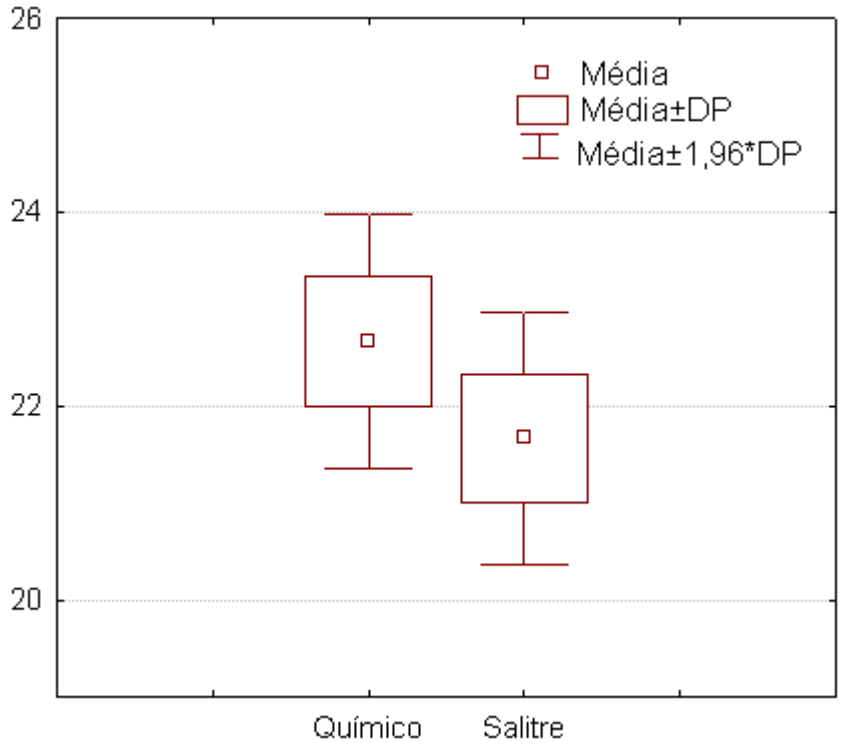


Figura 5.6 - Gráfico Box & Whisker para o teste t de *Student* para a comparação entre as médias obtidas na produção de biossurfatante utilizando como fonte de nitrogênio o reagente P.A. ou o fertilizante Salitre do Chile e tendo como resposta final o ΔDMC^{-1} do mosto fermentado.

Graficamente, pode ser observado que as médias estão próximas e as médias ± 1,96* DP de ambas as fontes de nitrogênio estão parcialmente sobrepostas. O valor de 1,96 se refere ao nível de confiança de 95% na distribuição normal, ou seja, normalizando os valores obtidos, 95% deles devem estar entre -1,96*DP e +1,96*DP.

Oliveira *et al.* (2006) estudaram a produção de biossurfatante por *Pseudomonas aeruginosa* FR, utilizando fertilizante comercial N:P:K (10:10:10) Ouro Verde como fonte de nutrientes (nitrogênio, fósforo e potássio). O uso do produto comercial favoreceu o crescimento celular e a produção de biossurfatante de modo análogo ao determinado nos meios convencionais, isso é, nos meios preparados com reagentes P.A.

Portanto, em não havendo razão estatística para optar pelo reagente químico em detrimento ao fertilizante, seguiu-se com esse último na condução dos testes.

5.6 Melhor relação carbono (óleo de soja DF) e nitrogênio (fertilizante)

Um planejamento fatorial completo 2^2 com ponto central foi realizado a fim de se obter as melhores concentrações de carbono e nitrogênio, bem como, analisar de forma indireta a relação C/N. A Tabela 5.4, a seguir, mostra os níveis (analisados com seus valores escalonados), bem como as respostas obtidas.

Tabela 5.4 – Variáveis escalonadas utilizadas no planejamento.

Ensaio	Carbono	Nitrogênio	ΔDMC^{-1} (DP)
1	-	-	17,5
2	+	-	22,5
3	-	+	22
4	+	+	23
PC	0	0	22,0 (1)

PC – Ponto Central; DP – Desvio-padrão.

Os dados da tabela acima foram submetidos a uma ANOVA, com os resultados expostos na tabela a seguir (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 – ANOVA do planejamento 2^2 com ponto central e resposta ΔDMC^{-1}.

	SQ	GL	MS	F	p
Curvatura	1,2273	1	1,2273	1,4727	0,2705
(1)Carbono	18,0000	1	18,0000	21,6000	0,0035
(2)Nitrogênio	12,5000	1	12,5000	15,0000	0,0082
1 by 2	8,0000	1	8,0000	9,6000	0,0212
Erro	5,0000	6	0,8333		
Total SQ	44,7273	10			

A curvatura não é estatisticamente significativa, ou não existe evidência de curvatura, pois o valor p 0,2705 é maior do que 0,05 (valor p do teste com 95% de confiança) indica dessa forma, que não é necessária a adição de pontos axiais nos experimentos para melhorar o modelo. Entretanto, as duas variáveis, bem como sua interação, foram significativas. Pode-se inferir que a relação entre carbono e nitrogênio é uma relação importante na produção de biossurfatante. O R^2 do modelo quadrático foi de 0,86.

A Figura 5.7 apresenta o gráfico de Pareto, onde se pode observar claramente os efeitos importantes, bem como a não significância estatística da curvatura no modelo.

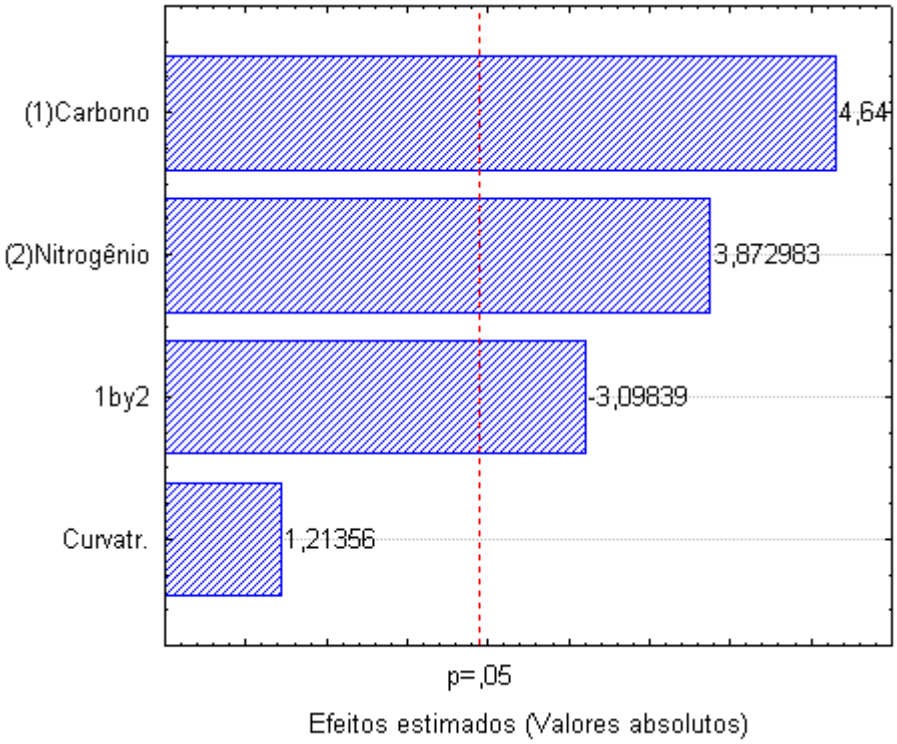


Figura 5.7 - Gráfico de Pareto para planejamento 2^2 com ponto central.

As Figuras 5.8 e 5.9 mostram a tendência de deslocamento do ponto ótimo para uma região com 100 mL de óleo de soja DF e 8,8 g de salitre. Neste estudo buscou-se, *a priori*, avaliar os efeitos do carbono e nitrogênio. A relação óleo de soja (100mL) e 8,8 g de salitre do Chile foi a que apresentou maior ΔDMC^{-1} (23 mN/m). O aumento da relação entre carbono e nitrogênio para, teoricamente 130, ocorreu um decréscimo na produção do bioproduto, e como no presente trabalho não foi avaliada a relação C/N, e apesar dos resultados indicarem claramente a interação entre carbono e nitrogênio, faz-se necessário novos estudos para garantir que o ponto ótimo foi conseguido.

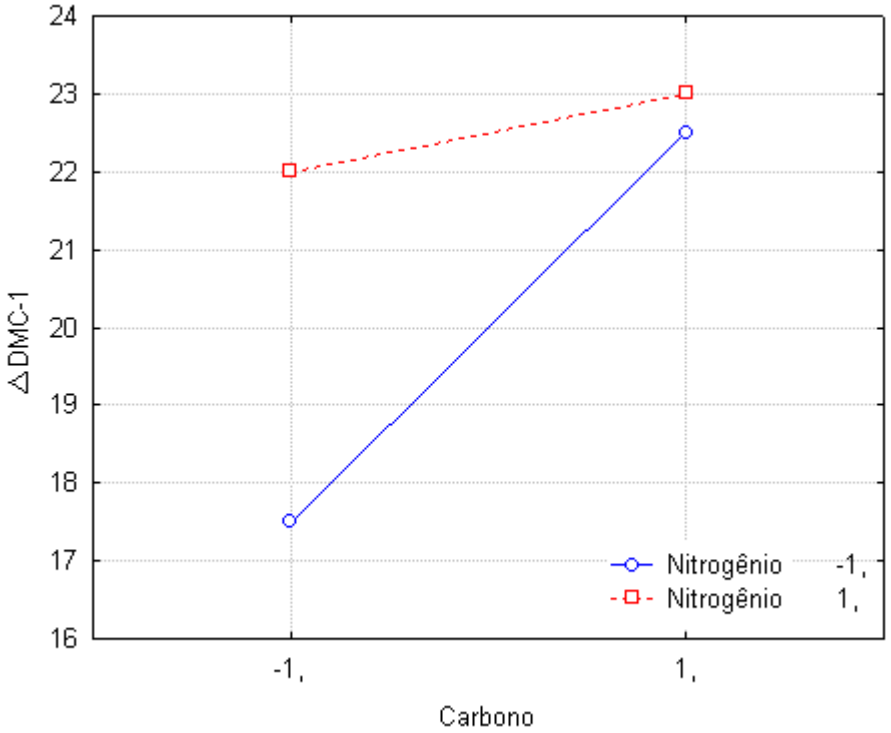


Figura 5.8 - Gráfico de médias marginais tendo ΔDMC^{-1} como resposta.

No gráfico de médias marginais, quando as linhas são paralelas, isso indica que não há interação entre os fatores. Na Figura 5.8 é facilmente visualizada a interação dos fatores.

A Figura 5.9 apresenta a superfície de resposta para o planejamento 2^2 com ponto central. Apesar de estatisticamente não haver curvatura no modelo, observa-se que os valores estudados das variáveis, tanto para carbono (100 mL/L) e nitrogênio (8,8 g/L), extrapolaram a tendência central (55 mL/L de óleo de soja e 6,6 g/L de fertilizante), ou seja, as diferenças observadas no ponto central e nos níveis superiores demonstram pouca tendência de incremento. Isso pode ocorrer, pois, como as variáveis foram estudadas numa ampla gama, variando de 10 a 100 mL/L de fonte de carbono e somente dobrando a quantidade de salitre do Chile (4,4 g e 8,8 g/L), o ponto ótimo pode estar entre os valores estudados.

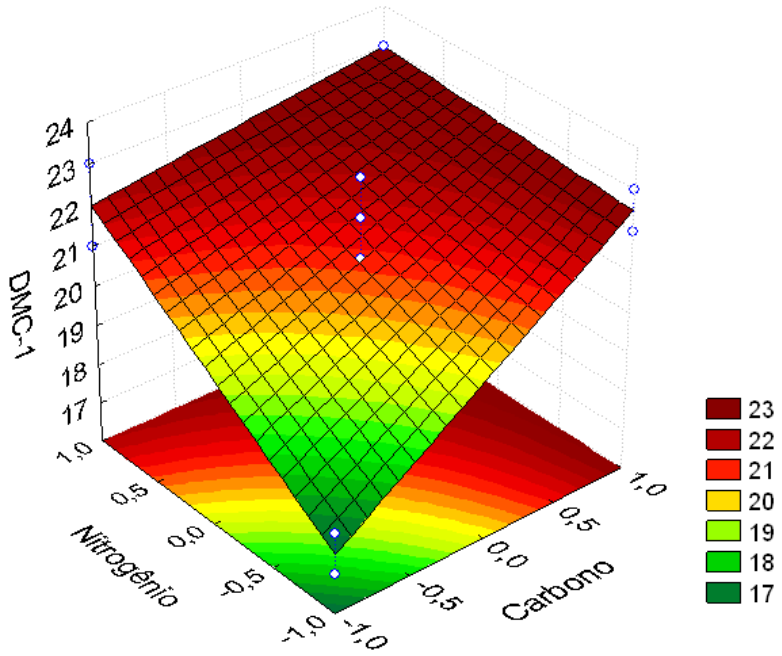


Figura 5.9 - Superfície de resposta para o ΔDMC^{-1} do planejamento 2^2 com PC.

A Figura 5.10 apresenta o gráfico de distribuição normal dos resíduos. Como se pode observar no gráfico, os pontos estão próximos à reta, indicando a normalidade dos dados.

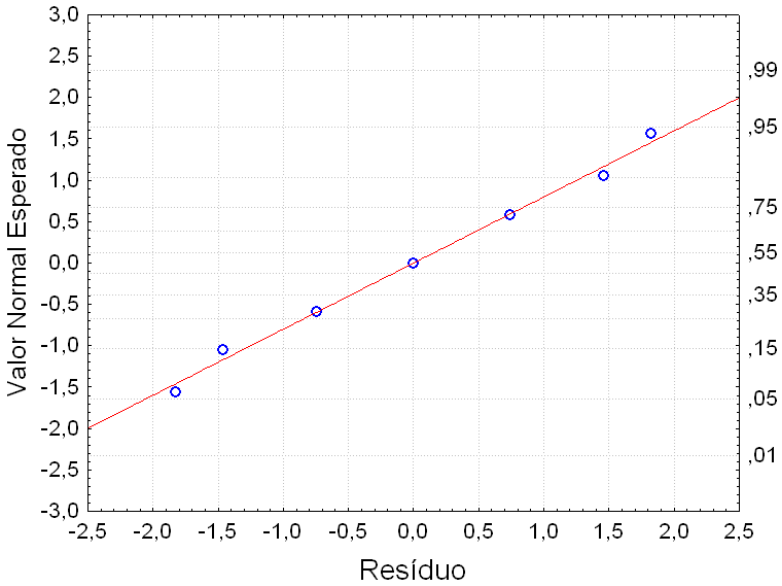


Figura 5.10 - Distribuição normal dos resíduos do planejamento 2^2 com ponto central.

Conforme a Tabela 5.4, onde se pode ser observado que os valores finais de resposta foram muito próximos - 17,5 e 23 mN/m - mesmo para relações de C/N variando de 10 a 100 mL/L de óleo de soja e 4,4 a 8,8 g/L de salitre do Chile, pode ser constatado pela análise do gráfico das médias marginais (Figura 5.8) em conjunto com o gráfico de superfícies de resposta (Figura 5.9) que ambos os fatores estudados (carbono e nitrogênio) são variáveis importantes na resposta da tensão superficial.

6 Considerações finais

A contribuição técnica deste estudo no cenário do desenvolvimento de bioprodutos ainda é incipiente. Mas, os resultados obtidos corroboram a possibilidade de serem produzidos, a partir de rejeitos industriais, produtos alternativos, mais eficientes e não poluentes, aos produtos normalmente usados em diferentes setores industriais. O uso de rejeitos industriais além de reduzir o custo do bioprocesso, reduz a carga de poluentes que diariamente contribui para o impacto no ambiente.

O óleo de soja queimado, apesar da possibilidade de uso em outras atividades tecnológicas, seria de interesse dada à vasta disponibilidade no território nacional, particularmente nas capitais e cidades mais desenvolvidas. Segundo Phan *et* Phan (2008), os custos dos óleos vegetais residuais podem ser duas a três vezes inferiores aos seus correspondentes óleos virgens.

A próxima etapa será caracterizar as moléculas com propriedades tensoativas produzidas pela linhagem isolada de *Flavobacterium* sp. a fim de definir as possíveis aplicações.

7 CONCLUSÕES

A partir das análises dos resultados, conclui-se que:

- A linhagem Flavobacterium AU-1, isolada de solo contaminado com hidrocarbonetos, se mostrou capaz de produzir biossurfatante a partir de diferentes fontes de carbono (dextrose, açúcar cristal, e óleos de soja, in natura e após uso para fritura de alimentos) visto a redução da tensão superficial do meio após 48 horas de crescimento;

- A biossíntese do composto tensoativo ocorreu independente do uso de fontes de carbono solúvel (açúcar cristal) ou insolúvel (óleos de soja *in natura e* de fritura*);*

- O óleo de soja residual proveniente de fritura, dentre as três fontes de carbono estudadas, por meio da redução da tensão superficial se mostrou um apto para a produção de biossurfatante; sendo o tempo de processo nas condições nutricionais e ambientais ensaiadas de 24 horas;

- O planejamento de mistura mostrou que as porções unitárias de nitrato de sódio e ureia, comparativamente as demais fontes de nitrogênio testadas (sulfato de amônio, levedura residual cervejeira) foram mais favoráveis para a produção de flavolipídios pela linhagem isolada;

- A análise estatística em função da variação da diluição micelar crítica ΔDMC^{-1} revelou que é possível substituir o nitrato de sódio grau P.A. pelo fertilizante comercial salitre do Chile, uma fonte de menor custo.

8 SUGESTÕES

Baseado nos resultados apresentados na presente dissertação, sugere-se para estudos posteriores:

- Caracterizar as macromoléculas obtidas a partir de fontes solúveis e insolúveis;
- Avaliar a toxicidade do bioproduto;
- Estabelecer metodologia para quantificação deste biossurfatante;
- Avaliar as possíveis aplicações dos flavolipídios, particularmente, de uso mais nobre, agregando assim, valor ao biossurfatante;
- Maximizar rendimento e produtividade através do estudo dos componentes do meio, utilizando metodologias estatísticas como, por exemplo, planejamento de experimentos;
- Estudar as condições operacionais do bioprocesso como: aeração, agitação e temperatura de modo a favorecer a formação do bioproduto;
- Realizar o escalonamento do bioprocesso.

9 REFERÊNCIAS

ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, S.; NABI, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, *223*(1-3), 143-151, 2008.

ALADEDUNYE, F.; PRZYBYLSKI, R. Degradation and Nutritional Quality Changes of Oil During Frying. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, *86*(2), 149-156, 2009.

AMÉZCUA-VEGA, C.; POGGI-VARALDO, H.; ESPARZA-GARCÍA, F.; RÍOS-LEAL, E; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. **Bioresource Technology,** *98*(1), 237-240, 2007.

BALOGUN, S.; FAGADE, O. Screening for Surface-active Agent Producing Bacteria from Diesel Oil Polluted Tropical Soil. **World Applied Sciences Journal,** *3*(6), 930-933, 2008.

BANAT, I. M. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal - State of the Art. (Review). **Acta Biotechnologica**, *15*(3), 251-267, 1995.

BEHRING J.L.; LUCAS, M.; MACHADO, C.; BARCELLOS, I.O. Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação da CMC de surfactantes no ensino da química. **Química Nova**. 27(3),492-495, 2004 .

BEEBE, J. L.; UMBREIT, W. W. Extracellular Lipid of *Thiobacillus thiooxidans*. **J. Bacteriol**., *108*(1), 612-614, 1971.

BERNARDET, J. F.; NAKAGAWA, Y.; HOLMES, B. Proposed minimal standards for describing new taxa of the family *Flavobacteriaceae* and emended description of the family. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, *52*(3), 1049-1070, 2002.

BERNARDET, J.; BOWMAN, J. The Genus *Flavobacterium*. In **The Prokaryotes** pp. 481-531, 2006.

BODOUR, A. A.; DREES, K. P.; MAIER, R. M. Distribution of Biosurfactant-Producing Bacteria in Undisturbed and Contaminated Arid Southwestern Soils. **Appl. Environ. Microbiol**., *69*(6), 3280-3287, 2003.

BODOUR, A. A., *et al.* . Structure and Characterization of Flavolipids, a Novel Class of Biosurfactants Produced by *Flavobacterium* sp. Strain MTN11. **Appl. Environ. Microbiol**., *70*(1), 114-120, 2004.

BOGNOLO, G. Physicochemical and Engineering Aspects: Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A**, *152*(1-2), 41-52, 1999.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D.C. **Planejamento de experimentos usando o *Statistica***. Rio de Janeiro : E-Papers Serviços Editoriais, 2003. 260 p.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, *93*(6), 915-929, 2002.

COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E.; GERSON, F. Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 37(1), 4-10, 1979.

COSTA, S. G. V. A. D. O.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Produção de biotensoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** *28*, 34-38, 2008.

CUNHA, C. D.; DO ROSÁRIO, M.; ROSADO, A. S.; LEITE, S. G. F. *Serratia* sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. **Process Biochemistry** 39: 2277-2282, 2004.

DAVIS, D. A.; LYNCH, H. C.; VARLEY, J. The production of Surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. **Enzyme and Microbial Technology**, *25*(3-5), 322-329, 1999.

DESAI, J.; BANAT, I. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**., *61*(1), 47-64, 1997.

FERRAZ, C.; DE ARAÚJO, Á.; PASTORE, G. The influence of vegetable oils on biosurfactant production by *Serratia marcescens*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, *98-100*(1), 841-847, 2002.

FUHRHOP, J. H.; KÖNING, J. **Membranes and molecular assemblies: the synkinetic approach.** UK, The Royal Society of Chemistry. 1994. 227p.

HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology,** *88*(3), 379-387, 2000.

HAMME, J. D. V.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects : Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, *24*(6), 604-620, 2006.

HOGG, S. **Essential Microbiology.** John Wiley & Sons, 2005. 480 p

HOLMBERG, K.; Natural surfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. 6, 148-159. 2001.

HOMMEL, R. K.; STEGNER, S.; KLEBER, H.; WEBER, L. Effect of ammonium ions on glycolipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, *42*(2), 192-197, 1994.

ILORI, M.; AMOBI, C.; ODOCHA, A. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. **Chemosphere,** *61*(7), 985-992, 2005.

KLINGEBERG, M.; VORLOP, K. D.; ANTRANIKIAN, G.Immobilization of anaerobic thermophilic bacteria for the production of cell-free thermostable alpha-amylases and pullulanases. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 33: 494-500, 1990.

KNICKERBOCKER, C.; NORDSTROM, D. K.; SOUTHAM, G. The role of “blebbing” in overcoming the hydrophobic barrier during biooxidation of elemental sulfur by *Thiobacillus thiooxidans*. **Chemical Geology**, *169*(3-4), 425-433, 2000.

KOCH, A. K.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A.; REISER, J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **J. Bacteriol.**, *173*(13), 4212-4219, 1991.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, *7*(1-2), 12-20, 2002.

LIMA, C; FRANÇA, F; SÉRVULO, E; RESENDE, M; CARDOSO, V. Enhancement of rhamnoplipid production in residual soybean oil by an isolated strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology.** 140(1), 463-470, 2001.

LIMA, C.; RIBEIRO, E.; SÉRVULO, E.; RESENDE, M.; CARDOSO, V. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* grown in residual soybean oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, *152*(1), 156-168, 2009.

LIN, E.; CHEN, Y. Factors affecting mycelial biomass and exopolysaccharide production in submerged cultivation of *Antrodia cinnamomea* using complex media. **Bioresource Technology,** *98*(13), 2511-2517, 2007.

MADIGAM, M. T.; MARTINKO, M. J. **Microbiologia de Brock.** Prentice Hall Internacional, Inc. 2004.

MAKKAR, R.; CAMEOTRA, S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. **Journal of Surfactants and Detergents**, *2*(2), 237-241, 1999.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova.** 24(1), 87-93, 2001.

MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras - MG: UFLA, 2006. 729 p.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, *24*(11), 509-515, 2006.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, *133*(2), 183-198, 2005.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** Campinas, São Paulo: Editora da Unicamp, 2002. 401p.

NITSCHKE M.; COSTA S. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**. 18(5), 252-259, 2007 .

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**. 2002.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, *97*(2), 336-341, 2006.

OLIVEIRA, F.J.S.; VAZQUEZ L.; DE CAMPOS N.; DE FRANÇA F. Biosurfactants production by *Pseudomonas aeruginosa* FR using palm oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 131, 727-737, 2006.

PACHECO, G. J. **Produção de biossurfactantes por *Rhodococcus erythropolis* e sua aplicação na remoção de óleo de sedimentos arenosos**. 2008. 95p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PALANISAMY, P. Biosurfactant mediated synthesis of NiO nanorods. **Materials Letters**, *62*(4-5), 743-746, 2008.

PHAN, A. N.; PHAN, T. M. Biodiesel production from waste cooking oils. **Fuel,** *87*(17-18), 3490-3496, 2008.

PRUTHI, V; CAMEOTRA, S. Production of a biosurfactant exhibiting excellent emulsification and surface active properties by *Serratia marcescens*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 13(1):133-135,1997.

PORNSUNTHORNTAWEE, O.; WONGPANIT, P.; CHAVADEJ, S.; ABE, M.; RUJIRAVANIT, R. Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. **Bioresource Technology**, *99*(6), 1589-1595, 2008.

RAMANA, V. K.; KARANTH, N. G.; Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. **J. Chem. Tech. Biotechnol**. 45:249–257, 1989.

REIS, F.; SÉRVULO, E.; DE FRANÇA, F. Lipopeptide surfactant production by *Bacillus subtilis* grown on low-cost raw materials. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, *115*(1), 899-912, 2004.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Campinas, São Paulo: Casa do Pão Editora, 2005. 326p.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, *52*(2), 154-162, 1999.

SANIBAL, E. A. A.; MANCINI FILHO, J. Perfil de ácidos graxos trans de óleo e gordura hidrogenada de soja no processo de fritura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, *24*, 27-31, 2004.

SANTA ANNA, L. *et al*. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, *19*, 159-166, 2002.

SANTOS, A.; SAMPAIO, A.; VASQUEZ, G.; SANTA ANNA, L.; PEREIRA, N.; FREIRE, D. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, *98-100*(1), 1025-1035, 2002.

SANZ-MEDEL, A. e*t al*. Atomic Spectroscopy: Organised surfactant assemblies in analytical atomic spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, *54*(2), 251-287, 1999.

SHABTAI, Y.; DAYA-MISHNE, N. Production, purification, and properties of a lipase from a bacterium (*Pseudomonas aeruginosa* YS-7) capable of growing in water-restricted environments. **Appl. Environ. Microbiol**., *58*(1), 174-180, 1992.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; **Biotecnologia Industrial.** Volume 2. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. 541 p.

SINGH, A.; HAMME, J. D. V.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, *25*(1), 99-121, 2007.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends in Biotechnology**, *22*(3), 142-146, 2004.

THANIYAVARN, J., *et al.* Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* A41 using palm oil as carbon source. **The Journal of General and Applied Microbiology**, *52*(4), 215-222, 2006.

TRIOLA, M. **Introdução à estatítica**. LTC, 1999.

URUM, K.; PEKDEMIR, T. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. **Chemosphere**, *57*(9), 1139-1150, 2004.

VALPUESTA, R. R. F.; **Otimização da Produção de Biossurfactantes por Isolado de *Bacillus subtilis* a partir de matéria prima renovável**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2008. 95p.

WU, J.; YEH, K.; LU, W.; LIN, C.; CHANG, J. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. *Bioresource Technology*, *99*(5), 1157-1164, 2008.

www.abiove.com.br. Acesso em 25/09/2008

www.biodieselbr.com.br. Acesso em 25/09/2008

XIE, Y.; YE, R.; LIU, H. Physicochemical and Engineering Aspects : Synthesis of silver nanoparticles in reverse micelles stabilized by natural biosurfactant. **Colloids and Surfaces A**, *279*(1-3), 175-178, 2006.

YAMADA, E. A.; ALVIM, I. D.; SANTUCCI, M. C. C.; SGARBIERI, V. C. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista de Nutrição**, *16*, 423-432, 2003.

ZANA, R. **Dynamics of surfactant self-assemblies: micelles, microemulsions, vesicles, and lyotropic phases.**(Surfactant science series ; v. 125) New York: CRC Press, 2005. 539.

ZOUBOULIS, A. I.; MATIS, K. A.; LAZARIDIS, N. K.; GOLYSHIN, P. N. The use of biosurfactants in flotation: application for the removal of metal ions. **Minerals Engineering**, *16*(11), 1231-1236, 2003.