PRODUÇÃO DE LIPASE DE *Yarrowia lipolytica* EM BIORREATOR MULTIFÁSICO

PRISCILLA FILOMENA FONSECA AMARAL

TESE APRESENTADA AO CORPO DOCENTE DO CURSO 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 DOUTOR EM CIÊNCIAS.

Orientadores:

Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

Maria Helena Miguez da Rocha-Leão, D.Sc.

ESCOLA DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
2007

PRODUÇÃO DE LIPASE DE *Yarrowia lipolytica* EM BIORREATOR MULTIFÁSICO

Priscilla Filomena Fonseca Amaral

Tese submetida ao corpo docente do curso 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 Doutor em ciências.

Aprovada por:

Orientadores

_____

Prof[a]. Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc.

_____

Prof[a]. Maria Helena Miguez da Rocha-Leão, D.Sc

Banca Examinadora

_____

Prof[a]. Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.

_____

Prof[a]. Francisca Pessoa de França, D. Sc.

_____

Prof[o]. João A. P. Coutinho, Ph. D.

_____

Prof[o]. Roberto de Campos Giordano, D. Sc.

_____

Prof[o]. Tito Lívio Moitinho Alves, D. Sc.

Rio de Janeiro, R.J. - Brasil

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

AMARAL, PRISCILLA FILOMENA FONSECA

Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em Biorreator Multifásico – [Rio de Janeiro] 2007.

xix, 221 p. 29,7 cm .

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – EQ, 2007.

1. Perfluorocarboneto; 2. *Yarrowia lipolytica*; 3. Lipase; 4. oxigênio; 5. Biorreator Multifásico.

I. EQ/UFRJ.

II. Título (série)

DEDICATÓRIA

"*The best way to have a good idea is to have a lot of ideas*."

Linus Pauling

"As coisas mais insignificantes têm às vezes maior importância e é geralmente por elas que a gente se perde...."

Fiódor Dostoiévski

Como sempre, à ele: meu mestre, pai, amigo,...Ao meu avô Waldir.

Ao meu amor, companheiro, fonte de inspiração,...Meu querido Fernando.

AGRADECIMENTOS

Não poderia deixar de relatar meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a elaboração dessa tese.

Agradeço em primeiro lugar ao meu grande ídolo: meu avô Waldir, que sempre foi, pra mim, um exemplo de inteligência, competência e honestidade. E à minha avó Heloisa, sua grande companheira, que junto ao meu avô, me ensinou a ser uma pessoa melhor. Agradeço também pelas orações e pela torcida em todas as minhas conquistas. Pelo apoio e incentivo aos meus sonhos e ideais.

Ao meu marido, meu eterno amor, Fernando, pelo seu amor, dedicação e incentivo constantes. Pela companhia nas corridas, que me deram disposição para terminar essa tese; Pelos ensinamentos de professor e orientador, que foram extremamente importantes para eu compreender o que é ser um cientista; Pelo carinho e olhar especial nos momentos difíceis e pelo sorriso e brilho no olhar nas minhas vitórias.

À minha mãe pelo amor dedicado, pelas vibrações nos momentos importantes e pelo colo quando necessário. Por ter me ensinado desde sempre a ter bom senso nas minhas decisões e por tê-las apoiado.

Ao meu pai pelo seu incentivo contínuo à minha carreira, pelo orgulho declarado e pelo exemplo de busca ao crescimento profissional e pessoal.

Ao meu avô Rubens e minha vó Elza que sempre torceram por mim com orgulho e me deram grandes exemplos de vida.

Às minhas irmãs, Patricia e Tatiana, que além de serem as únicas que riem realmente das besteiras que eu falo, sempre torceram por mim com muito orgulho.

Ao pessoal do laboratório 113: Ana Cláudia, Ana Paula (minha "filhinha", aluna dedicada, que me ajudou muito em algumas análises da tese), Ana Iraidy (pelos ensinamentos, pelo sotaque cearense tão gostoso de ouvir, pela ajuda sempre que necessária,...), André (amigo, padrinho,...e agora, orientado...agradeço pela amizade e pelo apoio), Aretha, Ariana (pelo alto astral, companhia nas comemorações e até pelo seu jeito "arretado"), Bernardo, Cauê, Cláudia (minha orientada de projeto final), Dani (de Portugal, mas que eu conheci no lab. 113, e se mostrou ser uma pessoa maravilhosa, amiga e meiga), Diego, Etel (minha eterna consultora para assuntos aleatórios, valeu mesmo!), Gizele (minha aluna exemplar, com seus cadernos perfeitos e extrema organização...obrigada pela paciência e pela ajuda), Lívia, Luiza (a Lulu, que deixa o lab sempre limpinho e arrumadinho para que a gente volte a bagunçar tudo, agradeço pela torcida, pela amizade e pela ajuda), Mariana, Priscilla Finotelli, Rafael, Renata (minha orientada de projeto final), Roberta, Yovanka (que não é mais do lab, mas que me ensinou bastante no tempo em que esteve aqui), Tatiana (pela sua amizade, pelo delicioso cheiro de lasanha no lab. na hora do almoço, e pela ajuda sempre que necessária). Aos antigos alunos do laboratório com os quais eu debutei no mundo maravilhoso da ciência: Carlos André, KK, Bia, Michele, Fernanda, Fabiana, Sandro. Agradeço a todos pela ajuda e pelo alto astral de todos os dias. Valeu a força, galera!

À amiga, Roberta, a "Rober", pela sua amizade essencial nessa caminhada, pela companhia nos passeios "desestressantes", por estar sempre pronta a me ajudar, por ter

confiado em mim para ser sua orientadora de projeto final e ter sido uma aluna dedicada e paciente,...e enfim, por você ter aparecido na minha vida.

À Mari, que foi minha primeira aluna de IC e me ajudou a aprender a orientar. Agradeço também pela ajuda nos experimentos iniciais quando eu ia pro francês e por entender que o "meu metabolismo é diferente". Pela paciência e acima de tudo, pela amizade.

Ao pessoal da Universidade de Aveiro, que me receberam de braços abertos quando estive por lá e me ajudaram em tudo que precisei: João e Isabel pela orientação; À "Marinha", pela amizade e pelo trabalho em conjunto; À Ana Dias, minha amiga e irmã portuguesa, que me ajudou muito quando eu estive por lá e até me recebeu em sua casa, agradeço também a toda sua família, pela recepção calorosa e pelo carinho; Ao pessoal do laboratório: Ana Caço, Maria Jorge, Tozé, Pedro, Fátima, Fátima Mirante, Marian, Joana, Joana Trindade,...que não pouparam esforço em me ajudar em tudo que eu precisava. À Paula, pela amizade, companhia, pelo apoio total quando estive em Portugal, por fazer eu me sentir em casa.

Agradeço às minhas orientadoras que me fizeram compreender o verdadeiro ideal científico.

> À Alice, pelas inúmeras oportunidades à mim oferecidas. Pela paciência de sentar e discutir ponto a ponto cada resultado, o que foi indispensável para o andamento do trabalho. Pelas preocupações de "mãe" (mesmo não tendo idade para isso), pela confiança e pela amizade.
>
> À Maria Helena, pelos ensinamentos, pela experiência transmitida e pelas dicas sempre essenciais. Agradeço também pelo carinho, pela excelente companhia nas viagens e pelo bom humor.

Não poderia deixar de agradecer à "atriz" principal desta tese, a minha "filhinha" *Yarrowia lipolytica*, que me deu tantos resultados positivos, muitos que eu nem esperava, e me acompanhou durante toda a realização da tese, não me "deixando na mão", nem um segundo, até mesmo em Portugal.

Agradeço o apoio financeiro da Faperj, do CNPq e da CAPES.

Resumo da tese apresentada à EQ/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.).

Priscilla Filomena Fonseca Amaral

Outubro/2007

Orientadores: Profª. Maria Alice Zarur Coelho
Profª. Maria Helena Miguez da Rocha-Leão

Programa: Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

A disponibilidade de oxigênio para a biomassa é o fator limitante da produtividade de grande parte dos fermentadores que operam com organismos estritamente aeróbios devido à baixa solubilidade de oxigênio em ambientes aquosos, que são, em geral, os mais usados. A introdução de meios não convencionais, como solventes orgânicos, em biorreatores convencionais pode ser vista como um ajuste para melhoria desses processos. Este trabalho propõe uma investigação do emprego de perfluorodecalina, um perfluorocarboneto (PFC) utilizado como carreador de oxigênio em meios de cultivo, na produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, que é uma levedura estritamente aeróbia, visando melhorar a transferência de oxigênio e otimizar a respectiva produtividade. A lipase é um dos principais produtos obtidos do cultivo desse microrganismo além de ter grande importância comercial.

A utilização de PFC nos cultivos de *Y. lipolytica* em frascos agitados aumentou a taxa específica de crescimento celular e a taxa de consumo de glicose, quando estes foram submetidos a agitação de 160 e 250 rpm. A produtividade da lipase extracelular de *Y. lipolytica* aumentou 23 vezes com a adição de 20% (v/v) de PFC quando o sistema foi agitado a 250 rpm. Nesta condição de agitação, a concentração de PFC (entre 0 e 50% (v/v)) que promoveu maior aumento na produção de lipase foi 20% (v/v). A lipase produzida na presença de PFC apresenta estabilidade relativamente alta quando conservada na temperatura de – 4ºC.

Os cultivos realizados na presença de PFC apresentaram uma particularidade: a presença de células na fase do PFC, o que tornou necessário uma investigação sobre as características da superfície celular de *Y. lipolytica* de forma a determinar as interações

entre as células e a perfluorodecalina. Seis diferentes métodos de caracterização de superfície celular foram empregados para explicar este comportamento da cepa de *Y. lipolytica* na presença de PFC. *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 apresentou alta afinidade a solventes apolares (hexadecano, tolueno e hexano) e superfícies hidrofóbicas (poliestireno, filmes de hexametildisiloxano e filmes de octafluorociclobutano). As proteínas presentes na parede celular desta cepa parecem exercer um papel importante nessas características de superfície devido à redução do caráter hidrofóbico após a ação proteolítica da pronase.

A interação entre microrganismos e compostos hidrofóbicos também pode ocorrer através de um surfactante e, portanto, investigou-se a produção de agentes emulsionantes durante o cultivo de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. Foi detectada alta atividade emulsionante no meio de cultivo contendo glicose como fonte de carbono e o bioemulsionante produzido foi isolado e caracterizado. Este bioemulsionante, denominado Yansan, apresentou alta atividade e estabilidade emulsionante na faixa de pH entre 3,0 e 9,0 e foi capaz de estabilizar emulsões do tipo água em óleo com vários hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, assim como com perfluorocarbonetos.

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, k_La, é uma dos parâmetros mais importantes em bioprocessos aeróbios. Portanto, medidas de k_La em um biorreator de 2 L agitado e aerado foram realizadas para se identificar as condições operacionais ótimas para o cultivo de *Y. lipolytica* na presença de perfluorodecalina. Este estudo mostra que as melhores condições experimentais para a transferência de oxigênio foram: a concentração de 20% (v/v) de PFC, a utilização de dois impelidores do tipo *Rushton* com seis lâminas verticais e a presença de meio YPD como fase aquosa, com um valor de k_La de 64.6 h^{-1}. Além disso, mostrou-se que a presença de óleo de oliva como segunda fase líquida não beneficiou a taxa de transferência de oxigênio. Através de medidas de tensão interfacial entre a água e o PFC, a água e o ar e o PFC e o ar, foi possível estabelecer que aumento da taxa de transferência de oxigênio promovido pela adição de PFC é devido ao alto coeficiente de difusão e alta solubilidade do oxigênio na fase dispersa (PFC), através de um mecanismo onde as gotas da fase dispersa carregam o oxigênio da interface gás-líquido para o seio da fase contínua (água ou fase aquosa), o chamado "*shuttle mechanism*". A presença de células como partículas (inativas) apresentaram uma influência positiva na transferência de oxigênio quando o sistema foi agitado a 350 rpm.

No cultivo de *Y. lipolytica* realizado em biorreator de 2 L agitado e aerado, o efeito benéfico da adição de 20% (v/v) de perfluorodecalina só foi evidenciado com agitação do sistema maior que 350 rpm. A partir desse valor de agitação, o PFC começou a ser totalmente disperso, permitindo o aumento da transferência de oxigênio nos cultivos. Com o aumento da agitação para 550 e 650 rpm houve um aumento da

taxa de crescimento celular e consumo de glicose ainda maior com a adição de PFC. A produção de lipase foi beneficiada pela adição de PFC em todas as velocidades de agitação estudadas. Medidas de k_La durante o cultivo revelaram uma relação linear entre a produção máxima de lipase e o coeficiente de transferência do oxigênio do meio, o que demonstra a influência da taxa de transferência de oxigênio na produção de lipase de *Y. lipolytica*.

A avaliação econômica do processo de produção de lipase por *Y. lipolytica* em biorreator de 2 L em meio YPD* sob agitação de 650 rpm e aeração de 1,5 L min^{-1} mostrou que este processo só é economicamente viável quando realizado na presença de PFC.

Abstract of a Final Project presented to EQ/ UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

Priscilla Filomena Fonseca Amaral

October/2007

Supervisors: Profª. Maria Alice Zarur Coelho
Profª. Maria Helena Miguez da Rocha-Leão

Programe: Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

The inadequate supply of oxygen to biomass is a critical factor to the productivity of most aerobic submerged fermentations due to low oxygen solubility in aqueous environments. The introduction of nonconventional media, as organic solvents, in conventional bioreactors can be regarded as an adjustment which will improve fermentation processes. The purpose of the this work was to investigate the utilization of perfluorodecalin, a perfluorocarbon (PFC) used as an oxygen carrier in culture media, in lipase production from *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, which is a strictly aerobic yeast, to improve the oxygen transfer rate and optimize its productivity. Lipase is one of the main products obtained in the culture of this microorganism and has high commercial importance.

PFC utilization in *Y. lipolytica*'s growth medium in agitated flasks has raised the specific growth rate and glucose consumption rate, when the flasks were agitated at 160 and 250 rpm. Extracellular lipase productivity by *Y. lipolytica* was enhanced 23-fold with the addition of 20% (v/v) PFC at 250 rpm. In these conditions, the PFC concentration (between 0 and 50% (v/v)) which promoted higher raise in lipase production was 20% (v/v). The lipase produced in the presence of PFC presents high stability when conserved at temperature of – 4ºC.

There was a particularity in the experiments performed in the presence of PFC: the presence of cells in the PFC phase. The investigation of *Y. lipolytica* cell surface characteristics became necessary to determine the interactions between the cells and perfluorodecalin. Six different methods to characterize cell surfaces were employed to explain the cell surface behavior of this strain in the presence of PFC. *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 presents high affinity to non polar solvents (hexadecane, toluene and

hexane), and to hydrophobic surfaces (polystyrene, hexamethyldisiloxane film and octafluorocyclobutane film). The proteins present on *Y. lipolytica*'s cell wall seems to play an important role in these particular surface characteristics because of the consistent reduction of this yeast hydrophobic character after the proteolytic action of pronase on its cell wall.

The interaction between micoorganisms and hydrophobic compounds may also be mediated by a surfactant. Therefore, the production of emulsifying agents during *Yarrowia lipolytica*'s IMUFRJ50682 growth has been investigated. Emulsification activity was detected in the culture medium with glucose as carbon source and the bioemulsifier produced was successfully isolated and characterized. This bioemulsifier, named Yansan, presented high emulsification activity and stability in the pH range of 3.0-9.0 and was capable of stabilizing oil-in-water emulsions with several aliphatic and aromatic hydrocarbons, as well as with perfluorocarbons.

The volumetric oxygen transfer coefficient (k_La) is one of the most important parameters in aerobic bioprocesses. Therefore, k_La measurements in a submerged aerated 2-L bioreactor were performed to identify optimal operations conditions for *Y. lipolytica* growth in the presence of perfluorodecalin. This study shows that the best experimental conditions where achieved with a perfluorodecalin concentration of 20% (v/v), mixing using two *Rushton* turbines with six vertical blades and in the presence of YPD medium as the aqueous phase, with a k_La value of 64.6 h^{-1}. Furthermore it is shown that the presence of olive oil as a second liquid phase is not beneficial to the oxygen transfer rate enhancement. By surface tension measurements between water and PFC, water and air and PFC and air, it was possible to establish that the raise in oxygen transfer rate promoted by PFC addition is because of its high diffusion coefficient and high solubility of oxygen. The mechanism of the oxygen transfer involves PFC droplets carrying the oxygen from gas-liquid interface to the bulk of the medium, the so called "shuttle mechanism". The presence of cells as particles had a positive influence in oxygen transfer when the system was agitated at 350 rpm.

The beneficial effect of the addition of 20% (v/v) of PFC in *Y. lipolytica* lipase production experiments in a submerged aerated and agitated 2-L bioreactor was only evidenced with agitation speed higher than 350 rpm. Beyond this value, the PFC was totally dispersed, which caused the raise in the oxygen transfer of the medium. There was a higher increase in specific growth rate and glucose consumption rate with the raise in agitation speed to 550 and 650 rpm. Lipase production was beneficiated by PFC addition in all agitation speed studied. $k_L a$ measurements during growth reveled a linear relation between lipase maximum productivity and $k_L a$, demonstrating the influence of oxygen transfer rate in lipase production from *Y. lipolytica*.

Economic evaluation of *Y. lipolytica* lipase production in a submerged aerated and agitated 2-L bioreactor with YPD* medium at an agitation speed of 650 rpm and aeration rate of 1,5 l min^{-1} has shown that this process presents economic viability only with the addition of PFC.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO 1
2. OBJETIVOS 7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 9
3.1. Perfluorocarbonetos (PFC's) 9
3.1.1. Conceito 9
3.1.2. Aplicações 11
3.2. Transferência de Massa em Sistemas Multifásicos 14
3.2.1. Transferência de Massa em Biossistemas gás-líquido 15
3.2.2. Os Mecanismos de Transferência de Massa nos Sistemas Multifásicos 20
3.2.3. Parâmetros Influenciados pela Presença da Fase Líquida Dispersa 23
3.3. Yarrowia lipolytica 28
3.3.1. Consumo de Substratos Hidrofóbicos e a Superfície Celular 30
3.4. Produção de Lipase 34
3.4.1. Lipases 36
3.4.2. Condições de Produção das Lipases 45
4. METODOLOGIAS EXPERIMENTAIS 55
4.1. Materiais 55
4.2. Equipamentos 55
4.3. Microrganismos 56
4.4. Preservação 56
4.5. Cultivos 57
4.5.1. Experimentos Preliminares 57
4.5.2. Experimentos em Biorreator 58
4.5.3. Esterilização 60
4.5.4. Recuperação do PFC 60
4.6. Determinação da Capacidade de Transferência de Oxigênio 61
4.6.1. Método da Desgaseificação 61
4.6.2. Método Dinâmico 63
4.7. Solubilidade de lipase em PFC 65
4.8. Estabilidade da lipase obtida na presença de PFC 66
4.9. Medidas de Tensão Superficial 66
4.10. Métodos Analíticos 67
4.10.1. Quantificação do Crescimento Celular 67
4.10.2. Determinação de Glicose 67
4.10.3. Determinação da Atividade Lipásica 68
4.10.4. Determinação da Atividade Proteásica 70
4.11. Caracterização da Superfície Celular de Y. lipolytica 71
4.11.1. Preparação das Amostras 71
4.11.2. Adesão de Células a Superfícies Hidrofóbicas 72
4.11.3. Cromatografia de Interação Hidrofóbica (CIH) 73
4.11.4. Adesão Celular à Solventes 74
4.11.5. Medida do Ângulo de Contato 76
4.11.6. Potencial Zeta 79
4.11.7. Tratamento com Pronase 79
4.11.8. XPS (Espectroscopia Fotoeletrônica de raios-X, X-Ray Photoelectron Spectroscopy*)* 79
4.12. Detecção e Purificação do Emulsionante produzido por Y. lipolytica 80

4.12.1. Atividade Emulsionante ... 81
4.12.2. Estabilidade da Emulsão ... 81
4.12.3. Mecanismos de Envelhecimento de Emulsões formadas com Yansan ... 82
4.12.4. Purificação do Emulsionante ... 82
4.12.5. Medida de Ângulo de Contato ... 83
4.12.6. Concentração Micelar Crítica (CMC) ... 83
4.12.7. Potencial Zeta ... 84
4.12.8. Conteúdo Protéico ... 84
4.12.9. Composição de Monossacarídeos ... 85
4.12.10. Composição de Ácidos Graxos ... 85
4.12.11. Caracterização Química ... 85
5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE PFC NO CULTIVO DE *YARROWIA LIPOLYTICA* E NA PRODUÇÃO DE LIPASE ... 86
5.1. O Efeito do PFC no Cultivo de Yarrowia lipolytica ... 86
5.2. Presença de Células no PFC ... 89
5.3. O Efeito do PFC na Excreção da Lipase ... 90
5.4. O Efeito da Redução da Razão Volume de meio/Volume do frasco nos Cultivos com PFC ... 93
5.5. Efeito da Concentração de PFC na Produção de Lipase ... 96
5.6. Solubilidade da Lipase em PFC ... 97
5.7. Características da Lipase obtida nos Experimentos com PFC ... 100
5.7.1. Perfis de Atividade Lipásica ... 100
5.7.2. Estabilidade da Lipase ... 104
5.8. Conclusões Parciais do Capítulo 5 ... 106
6. CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE CELULAR DE *Y. LIPOLYTICA* ... 108
6.1. Adesão de Células à Superfícies Sólidas ... 109
6.1.1. Adesão a Poliestireno e Vidro ... 109
6.1.2. Adesão a Superfícies Modificadas ... 115
6.1.3. Cromatografia de Interação Hidrofóbica (CIH) ... 121
6.2. Adesão de Células a Solventes Orgânicos ... 124
6.2.1. Adesão Microbiana a Hidrocarbonetos (teste MATH) ... 125
6.2.2. Adesão Microbiana a Solventes (teste MATS) ... 126
6.2.3. Medida do Ângulo de Contato (MAC) ... 132
6.3. Conclusões Parciais do Capítulo 6 ... 134
7. DETECÇÃO E PURIFICAÇÃO DO EMULSIONANTE PRODUZIDO POR *Y. LIPOLYTICA* ... 136
7.1. Produção de Agentes Emulsionantes por Y. lipolytica ... 136
7.2. Caracterização Química do Yansan ... 138
7.3. Caracterização Físico-química do Yansan ... 140
7.4. Propriedades das Emulsões formadas com Yansan ... 143
7.4.1. Atividade Emulsionante de Emulsões formadas com Yansan ... 143
7.4.2. Mecanismos de Envelhecimento de Emulsões formadas com Yansan ... 146
7.5. Conclusões Parciais do Capítulo 7 ... 149
8. ESTUDO DA CAPACIDADE DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO DE UM BIORREATOR MULTIFÁSICO ... 151
8.1. A Influência do Volume Útil de Líquido ... 151
8.2. A Influência da Posição dos Impelidores ... 152
8.3. A Influência do Tipo de Impelidor ... 153
8.4. A Influência da Concentração de PFC ... 155
8.5. A Influência da Fase Aquosa ... 157
8.6. A Influência da Fase Orgânica ... 158

8.7. A Influência das Células de Y. lipolytica 161
8.8. Correlação para o Coeficiente de Transferência de Massa 163
8.9. Conclusões Parciais do Capítulo 8 165
9. PRODUÇÃO DE LIPASE DE *Y. LIPOLYTICA* EM UM BIORREATOR MULTIFÁSICO 167
9.1. Cinética de Crescimento Celular 167
9.2. Produção de Lipase 170
9.3. Aumento da Agitação do Sistema 173
9.3.1. Cinética de Crescimento Celular 173
9.3.2. Produção de Lipase 175
9.4. Conclusões Parciais do Capítulo 9 179
10. AVALIAÇÃO ECONÔMICA DA PRODUÇÃO DE LIPASE 180
10.1. Avaliação Econômica do Processo realizado na ausência de PFC 182
10.2. Avaliação Econômica do Processo realizado na presença de PFC 187
10.3. Conclusões Parciais do Capítulo 10 191
11. CONCLUSÕES 192
12. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 195
PRODUÇÃO CIENTÍFICA 196
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 201

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Exemplos do uso de hidrocarbonetos e perfluorocarbonetos como uma segunda fase líquida em biorreatores aerados e/ou agitados....4
Tabela 3.1. Solubilidades do oxigênio e do dióxido de carbono em PFC's líquidos (mmol.L^{-1} à pressão e temperatura padrões) (LOWE et al., 1998)....10
Tabela 3.2. Solubilidade do oxigênio em água pura a 1 atm (BAILEY E OLLIS, 1986). 19
Tabela 3.3. Aplicações industriais de lipases microbianas (Fonte: SHARMA *et al.*, 2001). 36
Tabela 3.4. Composição de ácidos graxos em alguns óleos e gorduras (Fonte: MORRISON e BOYD, 1992). 37
Tabela 3.5. Algumas lipases microbianas comercialmente disponíveis (Fonte: JAEGER e REETZ, 1998; VAKHLU e AVNEET, 2006)....39
Tabela 4.1. Composição do meio de cultivo dos experimentos com perfluorocarboneto. 57
Tabela 4.2. Características do biorreator e dos impelidores utilizados....59
Tabela 4.3. Propriedades de tensão superficial dos solventes utilizados no teste MATS (BELLON-FONTAINE *et al.*, 1996). 75
Tabela 4.4. Valores das componenets de tensão superficial dos líquidos utilizados na medida de ângulo de contato (RIJNAARTS *et al.* 1995)....78
Tabela 5.1. Parâmetros de crescimento celular determinados para *Yarrowia lipolytica* cultivada em frascos de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultivo YPD* com perfluorodecalina. Dados obtidos de AMARAL, 2003. 86
Tabela 5.2. Concentração de células de *Yarrowia lipolytica* na fase aquosa e na fase do PFC após o cultivo por 170 horas em frascos de 500 mL contendo 200 mL de meio YPD* sob agitação de 160 e 250 rpm com 20%(v/v) de PFC. 89
Tabela 5.3. Percentual de células de *Yarrowia lipolytica*, suspensas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, que após agitação de 250 rpm, na presença de 20% (v/v) de PFC, se apresentam na fase do PFC. 90
Tabela 5.4. Efeito do PFC na produtividade volumétrica da lipase dos cultivos de *Yarrowia lipolytica* em erlenmeyer de 500 mL com 200mL de meio YPD* sob agitação de 160 e 250 rpm. Dados obtidos de AMARAL, 2003. 92
Tabela 5.5. Comparação entre os valores de produtividade relativa da lipase obtidos nos cultivos de *Yarrowia lipolytica* sob agitação de 250 rpm em meio YPD* em *Erlenmeyers* de volumes diferentes (500 mL e 1 l) e mesmos volumes de meio (200 mL). Dados obtidos de AMARAL, 2003....95
Tabela 5.6. Valores de obtidos em frascos de *Erlenmeyer* com meio YPD* e PFC agitados a 250 rpm com diferentes rações Vm/Vf (Volume de meio/Volume do frasco)....96
Tabela 5.7. Efeito do PFC na produtividade volumétrica da lipase, medida através dos métodos do espectrofotômetro e titulação, dos cultivos de *Y. lipolytica* em frasco de 1 L com 200 mL de meio YPD* sob agitação de 250 rpm....103
Tabela 6.1. Medida do ângulo de contato para as superfícies sólidas: poliestireno e vidro....110
Tabela 6.2. Componentes da tensão superficial e energia livre das interações para as superfícies sólidas: poliestireno e vidro....110
Tabela 6.3. Comparação entre a adesão de *Yarrowia lipolytica* W29 e *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ em poliestireno e vidro em força iônica de 10^{-1} M e pH 3, 5, 7 e 9. 115
Tabela 6.4. Tensão superficial das superfícies modificadas pelo fluxo superficial de nitrogênio misturado com hexametildisiloxano (HMDSO). Valores obtidos pela medida de ângulo de contato realizadas no Departamento de Física Eletrônica, da Faculdade de Ciências da Universidade de Masaryk na República Checa pelo Dr. Pavel Stahel. 116
Tabela 6.5. Tensão superficial das superfícies modificadas pelo fluxo superficial de nitrogênio misturado com octafluorociclobutano (C_4F_8). Valores obtidos pela medida de ângulo de contato realizadas no Departamento de Física Eletrônica, da Faculdade de Ciências da Universidade de Masaryk na República Checa pelo Dr. Pavel Stahel. 119
Tabela 6.6. Adesão e destacamento de células de *Yarrowia lipolytica* suspensas em tampão fosfato 0,1 ou 0,01 M, pH 7,0, em superfícies modificadas pelo fluxo de C_4F_8 com tempos de deposição diferentes. O desvio padrão variou de 5 a 11%....120
Tabela 6.7. Teste MATS (adesão microbiana à solventes) para duas cepas de *Y. lipolytica* e para uma cepa de *S. cerevisiae* do pré-inóculo (células crescidas em meio YPD por 48 horas sob agitação de 160 rpm). 128

Tabela 6.8. Medida do ângulo de contato para células de *Y. lipolytica* IMUFRJ e *Y. lipolytica* W29 crescidas em meio YPD por 48 horas a 160 rpm (pré-inóculo) e para células de *Y. lipolytica* IMUFRJ cultivadas em meio YPD* por 170 horas sob agitação de 250 rpm com e sem PFC. 132
Tabela 6.9. Componentes da tensão superficial e energia livre das interações para células de *Y. lipolytica* IMUFRJ e *Y. lipolytica* W29 crescidas em meio YPD por 48 horas a 160 rpm (pré-inóculo) e para células de *Y. lipolytica* IMUFRJ cultivadas em meio YPD* por 170 horas sob agitação de 250 rpm com e sem PFC. 133
Tabela 7.1. Composição dos biomeulsionantes produzidos por *Y. lipolytica* apresentados na litarura. 140
Tabela 7.2. CMC do Yansan, da goma arábica e da goma xantana obtidas pelo método da titulação turbidimétrica 141
Tabela 7.3. Valores de ângulo de contato e tensão superficial para o Yansan 142
Tabela 7.4. Atividade emulsionante e estabilidade das emulsões formadas com hidrocarbonetos aromáticos e o Yansan e estabilidade das emulsões sem Yansan 145
Tabela 7.5. Atividade emulsionante e estabilidade das emulsões formadas com perfluorocarbonetos e o Yansan e estabilidade das emulsões sem Yansan. 146
Tabela 8.1. Influência da fração volumétrica (Φ) de PFC nos valores de k_La, comparando as diferentes fases aquosas: meio YPD e água, utilizando impelidores do tipo *A*. O desvio padrão variou de 3 a 15%. 157
Tabela 8.2. Medidas de tensão superficial para água e água com perfluorodecalina ou óleo de oliva realizadas a 29ºC. Medida realizada em um tensiômetro NIMA DST 9005 da empresa *NIMA Technology, Ltd.* pelo aluno Pedro J. Carvalho, no laboratório CEFASI da Universidade de Aveiro (Portugal). 160
Tabela 8.3. Efeito da presença de 20% (v/v) de PFC nos valores de k_La na presença e ausência de células quando o sistema é agitado a 350 rpm, variando-se a taxa de aeração. 162
Tabela 9.1. Parâmetros de crescimento celular do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L (1,5 L de volume útil de meio) em YPD*, com aeração de 1,5 L min^{-1}. 169
Tabela 9.2. Parâmetros de produção de lipase do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L (1,5 L de volume útil de meio) em YPD*, com aeração de 1,5 L min^{-1}. 172
Tabela 9.3. Medidas de k_La realizadas com células inativas e durante o cultivo de *Yarrowia lipolytica* em meio YPD* sob agitação de 250 rpm na presença de 20% (v/v) de PFC e sob agitação de 350 rpm sem PFC. 173
Tabela 9.4. Parâmetros de crescimento celular determinados para o cultivo de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L (1,5 L de volume útil de meio) em YPD*, com aeração de 1,5 L min^{-1}. 174
Tabela 9.5. Parâmetros de produção de lipase do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L (1,5 L de volume útil de meio) em YPD*, com aeração de 1,5 dm^3 min^{-1}. 178
Tabela 10.1. Custos das matérias-primas do processo de produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L com 1,5 L de meio YPD* sob agitação de 650 rpm e aeração de1,5 L min^{-1}, na ausência de PFC. 183
Tabela 10.2. Custos da energia elétrica consumida durante o processo de produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L com 1,5 L de meio YPD* sob agitação de 650 rpm e aeração de1,5 L min^{-1}, na ausência de PFC. 184
Tabela 10.3. Custos da mão de obra necessária para o processo de produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L com 1,5 L de meio YPD* sob agitação de 650 rpm e aeração de1,5 L min^{-1}, na ausência de PFC. 185
Tabela 10.4. Folha de custos e ganhos para o processo de produção de lipase por *Y. lipolytica* em biorreator de 2 L com 1,5 L de meio YPD* sob agitação de 650 rpm e aeração de 1,5 L min^{-1}, na ausência de PFC. 186
Tabela 10.5. Custos das matérias-primas do processo de produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L com 1,2 L de meio YPD* e 300 mL de PFC, sob agitação de 650 rpm e aeração de1,5 L min^{-1}, na presença de 20% (v/v) de PFC. 187
Tabela 10.6. Custos de energia elátrica consumida durante o processo de produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L com 1,2 L de meio YPD* e 300 mL de PFC, sob agitação de 650 rpm e aeração de 1,5 L min^{-1}, na presença de 20% (v/v) de PFC. 190
Tabela 10.7. Folha de custos e ganhos para o processo de produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L com 1,2 L de meio YPD* sob agitação de 650 rpm e aeração de 1,5 L min^{-1}, na presença de PFC, considerando sua recuperação. 190

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Tipos de biorreatores, com diferentes sistemas para a transferência de oxigênio (SCHMIDELL et al., 2001). (1) bandeja ou lagoa; (2) reator de leito fixo; (3) coluna de bolhas; (4) *air-lift*; (5) tanque agitado e aerado; (6) *draught-tube*. 2
Figura 3.1. Estruturas químicas de perfluorocarbonetos: (A) perfluorodecalina, um PFC cíclico; (B) perfluoro-octil brometo, um PFC linear (Fonte: LOWE et al., 1998). 10
Figura 3.2. Diagrama esquemático dos passos envolvidos no transporte de oxigênio da bolha de ar para o interior do microrganismo (figura reproduzida de SHMIDELL *et al.* (2001)). 16
Figura 3.3. Transferência de oxigênio interfacial: perfis de concentração de oxigênio através dos dois filmes finos estagnados nos dois lados da interface gás-líquido. 17
Figura 3.4. Possíveis rotas (1, 2, 3, 4 ou 5) para a transferência de oxigênio de bolhas de ar para os microrganismos na presença de um vetor de oxigênio (segunda fase líquida). (ROLS *et al.*, 1990). 20
Figura 3.5. Esquema do mecanismo do complexo fase gasosa-fase orgânica (figura reproduzida de ROLS *et al.*, 1991). 21
Figura 3.6. Concentração do componente gasoso na fase líquida em diferentes concentrações da fase dispersa (da menor (1) a maior (5)) (figura reproduzida de ALPER *et al.*, 1980). 23
Figura 3.7. Curvas de resposta de oxigênio dissolvido em diferentes concentrações de PFC (resultado reproduzido de ELIBOL e MAVITUNA, 1997). (PFC % (v/v): •10, □20, ▲40, Δ50, ♦70). 27
Figura 3.8. Observações em microscópio de *Y. lipolytica* cultivadas em metil ricionelato. As gotas da fase oleosa são adsorvidas na superfície das células (imagens obtidas por AGUEDO *et al.*, 2003; 2004) 31
Figura 3.9. Observações em microscopia de fluorescência obtidas com a análise citométrica de um cultivo de *Y. lipolytica*. (B1) gotas de metil ricionelato coradas com vermelho do Nilo, (B2) células de levedura coradas com calcofluor e (B3) células de levedura na superfície (AGUEDO *et al.*, 2003). 33
Figura 3.10. Reação catalisada pela lipase. 36
Figura 3.11. A estrutura da lipase de *Pseudomonas aeruginosa*. As lâminas beta estão representadas como setas (vermelho escuro) e as a hélices como rolos (azuis e amarelas). Os resíduos do sítio ativo Ser82, Asp229 e His251 estão indicados e a posição potencial do íon Ca^{2+} (figura reproduzida de JAEGER e REETZ, 1998). 41
Figura 3.12. Esquema representativo das conformações "fechada" (A) e "aberta" (B) da lipase de *Rhizomucor miehei* (figura reproduzida de JÄÄSKELÄINEN et al. (1998). 41
Figura 3.13. Representação da estrutura de lipase de *B. Subtilis*. Os resíduos da triade cataítica , Ser77, His156 e Asp133 são representados por S, H e D, respectivamente. As letras N e C indicam os N e C terminas. (Fonte: POUDEROYEN *et al.*, 2001). 42
Figura 3.14. Mecanismo de reação de hidrólise de um éster por lipase (esquema reproduzido de HAEFFNER e NORIN, 1999). 43
Figura 3.15. Representação esquemática da localização da lipase durante o cultivo de células de *Y. lipolytica*: (I) fração solúvel intracelular; Fração intracelular ligada à célula; (E) fração extracelular (figura reproduzida de PEREIRA-MEIRELLES *et al.*, 2000). 44
Figura 3.16. Efeito da concentração de *Tween 80* na produção de lipase de *Y. lipolytica* 681 (Resultado reproduzido de CORZO e REVAH, 1999). 49
Figura 3.17. Correlação entre a produtividade da lipase e o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio k_La (Resultado reproduzido de ELIBOL e OZER, 2000). 53
Figura 4.1. Foto do Biorreator de bancada (Multigen, New Brunswick Scientific Co., EUA) com capacidade de 2 L. 58
Figura 4.2. Tipos de impelidores utilizados (*A* – turbina tipo *Rushton* com pás retas verticais; *B* - turbina tipo *Pitched* com pás inclinadas (Fluxo axial) e *C* – turbina tipo *Marine propeller* em hélice). 59
Figura 4.3. Monitoração da concentração de oxigênio dissolvido no meio durante a realização do método da desgaseificação com nitrogênio (BAILEY E OLLIS, 1986). 62
Figura 4.4. Representação logarítmica de ($1-C_L/C_L^*$) ao longo do tempo. 63
Figura 4.5. Variação da concentração de oxigênio com o tempo durante a execução do método dinâmico (SCHMIDELL, 2001). 64
Figura 4.6. Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* através de medidas de absorvância em espectrofotômetro HACH DR/4000. 67

Figura 4.7. Aparelho de medida de ângulo de contato OCA 15 plus (*Dataphysics*). (A) Câmera de vídeo; (B) Seringa; (C) Controle automático da seringa,; (D) base para colocação da amostra. 77
Figura 4.8. Imagem registrada pelo sistema de aquisição de imagens do aparelho OCA 15 plus (*Dataphysics*) no momento em que a gota de líquido toca a superfície. 77
Figura 4.9. Esquema de preparo de amostras para análise de XPS (adaptado de VAN DER MEI *et al*., 2000).....80
Figura 4.10. Exemplo de uma curva de trasmitância *versus* concentração de surfactante em que se determina a CMC do surfactante.....84
Figura 5.1. Foto dos tubos de ensaio contendo PFC e meio de cultivo com células. (A) Células de *Saccharomyces cerevisiae* submetidas à agitação intensa (vórtex); (B) Células de *Saccharomyces cerevisiae* submetidas à leve agitação manual; (C) Células de *Yarrowia lipolytica* submetidas à agitação intensa (vórtex) na ausência de oxigênio; (D) Células de *Yarrowia lipolytica* submetidas à agitação intensa (vórtex); (E) Células de *Yarrowia lipolytica* submetidas à leve agitação manual. 88
Figura 5.2. Atividade lipásica do sobrenadante do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em meio YPD* sob agitação de 160 rpm. (X) Controle (sem adição de PFC); (■) 10% (v/v) de PFC; (▲) 20% (v/v) de PFC. As linhas que ligam os pontos não correspondem ao perfil característico, são meramente para facilitar a visualização dos dados. Dados obtidos de AMARAL, 2003. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise.....91
Figura 5.3. Atividade lipásica do sobrenadante do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em meio YPD* sob agitação de 250 rpm. (X) Controle (sem adição de PFC); (■) 10% (v/v) de PFC; (▲) 20% (v/v) de PFC. As linhas que ligam os pontos não correspondem ao perfil característico, são meramente para facilitar a visualização dos dados. Dados obtidos de AMARAL, 2003. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise.....91
Figura 5.4. Atividade lipásica do sobrenadante do cultivo de *Y. lipolytica* em meio YPD* (200 mL em *Erlenmeyer* de 1L) sob agitação de 160 rpm. (X) Controle (sem adição de PFC); (▲) 20% (v/v) de PFC. As linhas que ligam os pontos não correspondem ao perfil característico, são meramente para facilitar a visualização dos dados. Dados obtidos de AMARAL, 2003. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise.....94
Figura 5.5. Atividade lipásica do sobrenadante do cultivo de *Y. lipolytica* em meio YPD* (200 mL em *Erlenmeyer* de 1L) sob agitação de 250 rpm. (X) Controle (sem adição de PFC); (▲) 20% (v/v) de PFC. As linhas que ligam os pontos não correspondem ao perfil característico, são meramente para facilitar a visualização dos dados. Dados obtidos de AMARAL, 2003. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise.....94
Figura 5.6. Influência da concentração de PFC na atividade lipásica do sobrenadante do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em meio YPD* (200 mL em erlenmeyer de 1L) sob agitação de 250 rpm. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise. 97
Figura 5.7. Varredura de comprimento de onda das amostras da suspensão com 0,50 mg mL^{-1} lipase LipIMUFRJ colocadas para agitar sem perfluorodecalina (Controle 2) (A) e com perfluorodecalina (Amostra 2) (B). 98
Figura 5.8. Varredura de comprimento de onda das amostras da suspensão com 6,00 mg mL^{-1} lipase comercial de *C. lipolytica* colocadas para agitar sem perfluorodecalina (Controle 4) (A) e com perfluorodecalina (Amostra 4) (B).....99
Figura 5.9. Atividade lipásica, medida pelo método espectrofotométrico (—○—) e pelo método da titulação (--●--), do sobrenadante do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em meio YPD* (200 mL em erlenmeyer de 1 L) sob agitação de 250 rpm com 0% (v/v) de PFC (controle). As linhas que ligam os pontos não correspondem ao perfil característico, são meramente para facilitar a visualização dos dados. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise. 101
Figura 5.10. Atividade lipásica, medida pelo método espectrofotométrico (—□—) e pelo método da titulação (--■--), do sobrenadante do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em meio YPD* (200 mL em erlenmeyer de 1L) sob agitação de 250 rpm com 10% (v/v) de PFC. As linhas que ligam os pontos não correspondem ao perfil característico, são meramente para facilitar a visualização dos dados. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise.....101
Figura 5.11. Atividade lipásica, medida pelo método espectrofotométrico (—△—) e pelo método da titulação (--▲--), do sobrenadante do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em meio YPD* (200 mL em erlenmeyer de 1L) sob agitação de 250 rpm com 20% (v/v) de PFC. As linhas que ligam os pontos não correspondem ao perfil característico, são meramente para facilitar a visualização dos dados. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise.....102

Figura 5.12. Perfis de estabilidade para a atividade lipásica dos extratos enzimáticos de lipase com (—○—) e sem (--●--) PMSF, mantidos na temperatura de 28º C. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise. 104
Figura 5.13. Perfis de estabilidade para a atividade lipásica dos extratos enzimáticos de lipase com (—□—) e sem (--■--) PMSF, mantidos a 4º C. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise. 105
Figura 5.14. Perfis de estabilidade para a atividade lipásica dos extratos enzimáticos de lipase com (—△—) e sem (--▲--) PMSF, mantidos na temperatura de -4º C. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise. 105
Figura 6.1. Imagens de microscopia ótica (1000 x) convertidas para escala de cinza de células de *Yarrowia lipolytica* aderidas em superfícies de poliestireno. As células foram suspensas em tampão fosfato 0,1 M, pH 3,0 (A); 5,0 (B); 7,0 (C); 9,0 (D). 111
Figura 6.2. Imagens de microscopia ótica (1000 x) convertidas para escala de cinza de células de *Saccharomyces cerevisiae* aderidas em superfícies de poliestireno. As células foram suspensas em tampão fosfato 0,1 M, pH 3,0 (A); 5,0 (B); 7,0 (C); 9,0 (D). 111
Figura 6.3. Exemplo das imagens obtidas pelo processamento de imagens: (A) imagem obtida através do microscópio convertida em escala de cinza; (B) imagem obtida após o processamento da imagem (A) em *Matlab® 6.1*. 112
Figura 6.4. Adesão de *Yarrowia lipolytica* em poliestireno em pH 3 (♦), pH 5 (■), pH 7 (▲) and pH 9 (x) e força iônica variando de 10^{-4} M to 10^{-1} M. O desvio padrão variou de 2 a 10%. 112
Figura 6.5. Influência do pH e da força iônica (KCl 0,1; 0,01 ou 0,001 M) no potencial zeta de uma suspensão celular de *Yarrowia lipolytica* cultivada por 48 horas em meio YPD sob agitação de 160 rpm. 113
Figura 6.6. Adesão de *Yarrowia lipolytica* em vidro em pH 3 (♦), pH 5 (■), pH 7 (▲) and pH 9 (x) e força iônica variando de 10^{-4} M to 10^{-1} M. O desvio padrão variou de 2 a 11%. 114
Figura 6.7. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para células de *Saccharomyces cerevisiae* (A e B) e *Yarrowia lipolytica* (C) depositadas em superfície de policarbonato modificada pelo fluxo de HMDSO de 0,064 g min^{-1} por 30 minutos. Barra de tamanho 30 μm. 118
Figura 6.8. Adesão de células de *Yarrowia lipolytica,* suspensas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, em superfícies modificadas pelo fluxo de HMDSO com tempos de depoisção diferentes. Fluxo de HMDSO (em g min^{-1}): 0,064 (♦), 0,087 (■), 0,115 (▲) 0,170 (x). O desvio padrão variou de 3 a 10%. 118
Figura 6.9. Retenção de células de *Yarrowia lipolytica* pelo gel cromatográfico na presença de alta força iônica, R_{AFI} (■) e na presença de baixa força iônica, R_{BFI} (□). (A) Células cultivadas por 48 horas em meio YPD. (B) Células cultivadas por 170 horas em meio YPD*. O desvio padrão foi menor que 4%. 122
Figura 6.10. Retenção de células de *Yarrowia lipolytica* W29 (A) e *Saccharomyces cerevisiae* (B) pelo gel cromatográfico na presença de alta força iônica, R_{AFI} (■) e na presença de baixa força iônica, R_{BFI} (□). O desvio padrão foi menor que 5%. 123
Figura 6.11. Retenção de células de *Yarrowia lipolytica* tratadas com pronase por 4 horas, pelo gel cromatográfico na presença de alta força iônica, R_{AFI} (■) e na presença de baixa força iônica, R_{BFI} (□).O desvio padrão foi menor que 4% 124
Figura 6.12. Teste MATH realizado com células de *Y. lipolytica* cultivadas por 48 horas em meio YPD. Taxa de remoção microbiana inicial (R_0) por *n*-hexadecano (A) e tolueno (B) como função do pH em diferentes tampões. O desvio padrão ficou entre 4 e 12%. 126
Figura 6.13. Teste MATH realizado com células de *Yarrowia lipolytica* cultivadas em meio YPD* sob agitação de 250 rpm. Taxa de remoção microbiana inicial (R_0) por *n*-hexadecano e tolueno em tampão PUM e pH 7,0. O desvio padrão foi menor que 8%. 126
Figura 6.14. Teste MATS realizado com células de *Yarrowia lipolytica* cultivadas em meio YPD sem PFC (A) e com 20% (v/v) de PFC (B) sob agitação de 250 rpm. A hidrofobicidade é avaliada pela adesão de células ao hexadecano: o caráter doador de elétrons é dado pelo % de adesão de células ao clorofórmio menos o % de adesão de células ao hexadecano; o caráter aceptor de elétrons é dado pelo % de adesão de células ao éter etílico menos o % de adesão de células ao hexano. 127
Figura 6.15. Hidrofobicidade da superfície celular dada pelo teste MATS realizado com células de *Y. lipolytica* cultivadas em meio YPD por 48 horas sob agitação de 160 rpm e tratadas com pronase. 129
Figura 6.16. Teste MATS realizado com células de *Y. lipolytica* cultivadas em meio YPD por 48 horas sob agitação de 160 rpm e tratadas com pronase. 130

Figura 6.17. Análise de espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS) de células de *Y. lipolytica* antes e depois do tratamento com pronase.....131
Figura 7.1. Atividade emulsionante e crescimento celular de *Y. lipolytica* em meio YPD. (A) Frasco agitado a 160 rpm, 0% perfluorodecalina; (B) Frasco agitado a 160 rpm, 20% perfluorodecalina; (C) Frasco agitado a 250 rpm, 0% perfluorodecalina; (D) Frasco agitado a 250 rpm, 20% perfluorodecalina.....137
Figura 7.2. Medida da CMC do Yansan pelo método da titulação turbidimétrica, sendo %T: transmitância.....141
Figura 7.3. Potencial zeta em função do pH para uma amostra contendo 100 mg de Yansan em 50 mL de KCl 10^{-3} M.....142
Figura 7.4. Efeito da concentração de hexadecano na atividade emulsionante formada por Yansan. A atividade emulsionante foi medida com 30 mg de Yansan e a quantidade de hexadecano variando de 15 a 3000 mg.....143
Figura 7.5. Efeito do pH na atividade emulsionante e estabilidade das emulsões formadas com hexadecano e Yansan (♦), *Tween* 80 (x), *Pluronic* F-68 (▲) e goma arábica (■). O desvio padrão foi menor que 10%.....144
Figura 7.6. Efeito do número de carbonos da cadeia carbônica de hidrocarbonetos alifáticos na atividade emulsionante (♦) e estabilidade (□) de emulsões com Yansan.....145
Figura 7.7. Evolução do diâmetro das micelas em função do tempo para emulsões com *n*-hexadecano em tampão pH 3 e Yansan (■) ou Goma arábica (Δ). As linhas tracejadas representam o mecanismo de coalescência.....148
Figura 7.8. Evolução do diâmetro das micelas em função do tempo para emulsões com *n*-hexadecano em tampão pH 7 e Yansan (■) ou Goma arábica (Δ). A linha tracejada representa o mecanismo de coalescência e a linha contínua representa o mecanismo de difusão molecular. 148
Figura 7.9. Evolução do diâmetro das micelas em função do tempo para emulsões em tampão pH 7 com Yansan e *n*-hexadecano na concentração de 15% (p/p) (■) ou 30% (p/p) (□). A linha contínua representa o mecanismo de difusão molecular.....149
Figura 8.1. Influência do volume útil de líquido nos valores de k_La utilizando água destilada, sob agitação de 250 rpm, com o impelidor do tipo *A* (turbina tipo *Rushton* com pás retas verticais), em função da taxa de aeração. Volume útil: (♦) 1,0 L; (▲) 1,5 L. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de replicatas. 152
Figura 8.2. Influência da posição dos agitadores nos valores de k_La no sistema com água e 20% (v/v) de PFC, sob agitação de 250 rpm, com impelidores do tipo *B*, em função da taxa de aeração: (♦) Posição 1: h_1 = 3,5 cm, h_2 = 3,0 cm; (▲) Posição 2: h_1 = 6,5 cm, h_2 = 1,0 cm; (■) Posição 3: h_1 = 3,5 cm, h_2 = 1,0 cm. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de replicatas. ..153
Figura 8.3. Influência do tipo de impelidor nos valores de k_La utilizando água destilada sob agitação de 100 e 250 rpm e taxa de aeração variando de 0,5 to 2,0 L·min^{-1}. Impelidores: *A*: Turbina tipo *Rushton* com seis lâminas verticais; *B*: Turbina tipo *Pitched Blade* (Fluxo axial) com seis lâminas; *C*: tipo *Marine propeller* com 3 lâminas).....154
Figura 8.4. Influência da fração volumétrica de PFC (Φ) nos valores de k_La em água destilada, utilizando três tipos de impelidores diferentes (*A*: Turbina tipo *Rushton* com seis lâminas verticais; *B*: Turbina tipo *Pitched Blade* (Fluxo axial) com seis lâminas; *C*: tipo *Marine propeller* com 3 lâminas), variando-se a agitação (100 e 250 rpm) e a taxa de aeração, L min^{-1}: (♦) 0,5; (Δ) 1,0; (□) 1,5; (×) 2,0. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de replicatas.....155
Figura 8.5. Influência da fração volumétrica de oleo de oliva (Φ) nos valores de k_La obtidos em água, com impelidores do tipo *A*, variando-se a velocidade de agitação (160 a 350 rpm) e a taxa de aeração, L min^{-1}: (▲) 1.0; (■) 1.5; (×) 2.0. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de replicatas. 159
Figura 8.6. Influência da fração volumétrica de PFC(Φ) nos valores de k_La com meio YPD, na ausência e presença de duas concentrações de células inativas de *Y. lipolytica*, com impelidores do tipo *A*, variando-se a velocidade de agitação (160 a 350 rpm) e a taxa de aeração, L·min^{-1}: (▲) 1,0; (■) 1,5; (×) 2,0. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de replicatas....161
Figura 8.7. Correlação entre os valores de k_La calculados pelo modelo e os experimentais obtidos em meio YPD, com células inativas, com a adição de PFC, variando-se a velocidade de agitação (160 a 350 rpm) e a taxa de aeração (1,0 a 2,0 L min^{-1}) (k_La_{exp}, valores experimentais de k_La), (k_La_{calc}, valores de k_La calculados pelo modelo).....165
Figura 9.1. Cinética de crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L (1,5 L de volume útil de meio) em YPD*, com aeração de 1,5 L min^{-1} nas seguintes condições de

agitação e concentração de PFC: (□) 250 rpm, 0% (v/v) de PFC; (■) 250 rpm, 20% (v/v) de PFC; (Δ) 350 rpm, 0% (v/v) de PFC; (▲) 350 rpm, 20% (v/v) de PFC.....168
Figura 9.2. Cinética de consumo de glicose por *Yarrowia lipolytica* cultivada em biorreator de 2 L (1,5 L de volume útil de meio) em YPD*, com aeração de 1,5 L min^{-1} nas seguintes condições de agitação e concentração de PFC: (□) 250 rpm, 0% (v/v) de PFC; (■) 250 rpm, 20% (v/v) de PFC; (Δ) 350 rpm, 0% (v/v) de PFC; (▲) 350 rpm, 20% (v/v) de PFC.....168
Figura 9.3. Concentração de oxigênio dissolvido (OD) durante o cultivo de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L (1,5 L de volume útil de meio) em YPD*, com aeração de 1,5 L min^{-1} nas seguintes condições de agitação e concentração de PFC: (□) 250 rpm, 0% (v/v) de PFC; (■) 250 rpm, 20% (v/v) de PFC; (Δ) 350 rpm, 0% (v/v) de PFC; (▲) 350 rpm, 20% (v/v) de PFC. 169
Figura 9.4. Cinética de produção de lipase durante o cultivo de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L (1,5 L de volume útil de meio) em YPD*, com aeração de 1,5 L min^{-1} nas seguintes condições de agitação e concentração de PFC: (□) 250 rpm, 0% (v/v) de PFC; (■) 250 rpm, 20% (v/v) de PFC; (Δ) 350 rpm, 0% (v/v) de PFC; (▲) 350 rpm, 20% (v/v) de PFC. O desvio padrão variou de 3 a 12%. 170
Figura 9.5. Concentração de oxigênio dissolvido (OD) durante o cultivo de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L (1,5 L de volume útil de meio) em YPD*, com aeração de 1,5 L min^{-1} nas seguintes condições de agitação e concentração de PFC: (○) 450 rpm, 0% (v/v) de PFC; (□) 550 rpm, 0% (v/v) de PFC; (■) 550 rpm, 20% (v/v) de PFC; (Δ) 650 rpm, 0% (v/v) de PFC; (▲) 650 rpm, 20% (v/v) de PFC.....175
Figura 9.6. Cinética de produção de lipase durante o cultivo de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L (1,5 L de volume útil de meio) em YPD*, com aeração de 1,5 L min^{-1}, nas seguintes condições de agitação e concentração de PFC: (□) 550 rpm, 0% (v/v) de PFC; (■) 550 rpm, 20% (v/v) de PFC; (Δ) 650 rpm, 0% (v/v) de PFC; (▲) 650 rpm, 20% (v/v) de PFC. O desvio padrão variou de 3 a 14%. 176
Figura 9.7. Cinética de produção de protease durante o cultivo de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L (1,5 L de volume útil de meio) em YPD*, com aeração de 1,5 L min^{-1}, nas seguintes condições de agitação e concentração de PFC: (□) 550 rpm, 0% (v/v) de PFC; (■) 550 rpm, 20% (v/v) de PFC; (Δ) 650 rpm, 0% (v/v) de PFC; (▲) 650 rpm, 20% (v/v) de PFC. 177
Figura 9.8. Correlação para a produção de lipase máxima de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L com k_La. 179
Figura 10.1. Diagrama de blocos do processo de produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2L. As linhas contínuasrepresentam o processo realizado na ausência de PFC e as linhas tracejadas representam o processo na presença de PFC. 181

1. INTRODUÇÃO

A maioria dos bioprocessos de interesse industrial envolve o cultivo de microrganismos e o acúmulo de seus produtos, como antibióticos, vitaminas, enzimas, ácido acético e/ou ácido cítrico. Tais processos são freqüentemente influenciados pela taxa de transferência de oxigênio no meio de cultura, principalmente no caso dos microrganismos aeróbios.

A concentração de saturação de oxigênio dissolvido em água é apenas da ordem de 7 mg/L (7 ppm), ao se borbulhar ar atmosférico à pressão de 1 atm e a 35ºC. Portanto, a limitação de oxigênio dissolvido no meio de cultura, devido à baixa solubilidade desse gás no meio aquoso, é um dos maiores problemas a serem enfrentados no desenvolvimento de bioprocessos aeróbios, pois quase sempre resulta em um crescimento celular lento e baixo rendimento de produtos. Vários exemplos dessa limitação, afetando a produtividade e/ou o crescimento celular em fermentações, são apresentados na literatura (ROXBURGH *et al.*, 1954; GHOMMIDH *et al.*, 1986; KAMZOLOVA *et al.*, 2003).

Como se sabe, do ponto de vista bioquímico, o oxigênio é o último elemento a aceitar elétrons, ao final da cadeia respiratória, levando à formação de água, permitindo que ocorra a reoxidação das coenzimas que participam das reações de desidrogenação (ao longo da glicólise e do ciclo de Krebs) e, ainda, permitindo o armazenamento de energia através da passagem das moléculas de ADP para ATP. Estas últimas, por sua vez, irão participar necessariamente das reações de síntese de moléculas para a sobrevivência das células e para o surgimento de novas células sendo fundamental a introdução de energia. Assim sendo, um cultivo que seja altamente eficiente, ocorrendo com elevadas velocidades de crescimento celular, significa altas velocidades de consumo da fonte de carbono, a fim de que haja abundância de elétrons transportados na cadeia respiratória (geração de ATP), mas significa também, obrigatoriamente, a necessidade da existência de oxigênio dissolvido, a fim de que esses elétrons sejam drenados ao final dessa cadeia (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Essas considerações tornam óbvia a necessidade de um adequado sistema de agitação e aeração em um meio de cultivo, para que se possa conduzir adequadamente um processo fermentativo aeróbio.

Em escala laboratorial, estudos biotecnológicos são geralmente desenvolvidos em frascos ou tubos de ensaio. Para o desenvolvimento de tais processos, melhores desempenhos são requeridos em escala maior, o que torna a tecnologia de biorreatores bastante importante.

Atualmente, existe uma variedade muito grande de biorreatores, como mostra a Figura 1.1, dos quais o tanque agitado e aerado (Figura 1.1 (5)) e a coluna de borbulhamento (Figura 1.1 (3)) são os mais simples e mais usados (VAN SONSBEEK *et al.*, 1993).

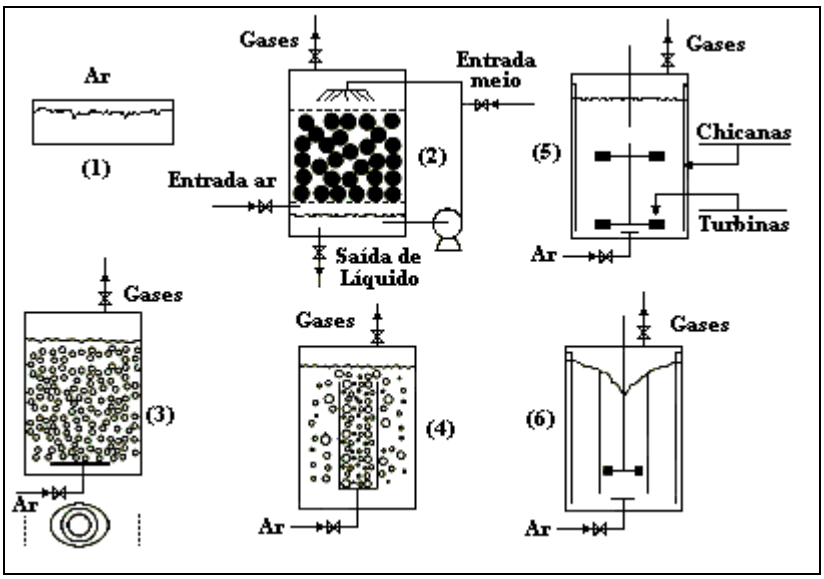

Figura 1.1. Tipos de biorreatores, com diferentes sistemas para a transferência de oxigênio (SCHMIDELL et al., 2001). (1) bandeja ou lagoa; (2) reator de leito fixo; (3) coluna de bolhas; (4) *air-lift*; (5) tanque agitado e aerado; (6) *draught-tube*.

Nos tanques agitados e aerados, as bolhas de ar que entram no reator são dispersas devido à ação das palhetas do agitador, o que proporciona uma maior área de transferência de oxigênio. Portanto, maiores taxas de transferência de oxigênio são atingidas, o que é de grande importância em processos aeróbios. Coluna de borbulhamento é um tipo de biorreator de simples construção e, por isso, atrai grande atenção. Em larga escala, esse tipo de reator é ainda mais atrativo, pois a aeração em altas taxas é mais simples do que a agitação.

Mesmo com a otimização dos biorreatores convencionais, a taxa de transferência de oxigênio é, ainda, em muitos casos, limitante devido à contradição existente entre a necessidade de oxigênio de muitos biocatalisadores e a baixa solubilidade deste gás em ambientes aquosos, que são, em geral, os mais usados (VAN SONSBEEK *et al.*, 1993). Além disso, o cultivo de células sensíveis ao cisalhamento, como células animais (CHO e WANG, 1988), células vegetais (WARDROP *et al.*, 1997a; b) e até mesmo células de levedura (ALONSO, 2001), pode ser prejudicado devido à redução da viabilidade destas com o aumento da velocidade de agitação.

Portanto, para se obter um suprimento de oxigênio apropriado é importante a escolha do tipo de biorreator e dos ajustes que devem ser realizados nas condições de processo para as necessidades específicas de cada aplicação. A introdução de meios não convencionais, como solventes orgânicos, em biorreatores convencionais pode ser vista como um ajuste para a melhoria desses processos (VAN SONSBEEK *et al.*, 1993). Tais solventes podem aumentar a solubilidade de substratos e/ou produtos, e ainda possibilitar reações hidrolíticas reversas, como a esterificação de ácidos graxos e álcoois (NOVAK *et al.*, 2003), o que não é possível em meios puramente aquosos.

Um grande número de solventes orgânicos pode ser aplicado em biorreatores, como alcanos, alcenos, ésteres, álcoois, perfluorocarbonetos, etc. Os hidrocarbonetos (HCs) e perfluorocarbonetos (PFCs) são conhecidos por apresentarem alta solubilidade de oxigênio e, conseqüentemente, por aumentarem a taxa de transferência de oxigênio em fermentações aeróbicas (LOWE, 1998). Portanto, têm sido usados com bastante freqüência como uma segunda fase líquida em biorreatores aerados e/ou agitados, como mostra a Tabela 1.1.

Os PFCs se destacam, pois podem dissolver grandes volumes de oxigênio, possuem altas estabilidades química e térmica e são líquidos imiscíveis com os sistemas aquosos, podendo ser facilmente recuperados após o término da batelada. Além disso, tem sido provado que esses compostos são inertes biologicamente, sem toxicidade frente a sistemas biológicos (LOWE et al., 1998).

A presença de uma fase orgânica, como o PFC, torna mais complexas a análise e a otimização das condições de operação. Isto porque o oxigênio deixa de se transferir apenas do ar para a fase aquosa e desta para a biomassa e passa a ser transferido através de um complexo jogo de transferências entre a fase gasosa e as fases líquidas, o que ora promoverá ora condicionará o acesso do oxigênio à biomassa. Vários pesquisadores já investigaram os mecanismos que governam a transferência de massa em sistemas multifásicos (ALPER *et al.,* 1980; ROLS *et al.,* 1990; VAN EDE *et al.*, 1995), entretanto, tais mecanismos ainda não estão completamente compreendidos.

Tabela 1.1. Exemplos do uso de hidrocarbonetos e perfluorocarbonetos como uma segunda fase líquida em biorreatores aerados e/ou agitados.

Autores	Sistema	Aparatos	Resultado
CHO e WANG, 1988	Absorção de oxigênio em sistema de perfluorocarboneto/ fase aquosa em um cultivo de hibridoma	Biorreator aerado e agitado	Aumento do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) com adição de PFC
HO *et al.*, 1990	Absorção de oxigênio em sistema de *n*-hexadecano/ fase aquosa em um cultivo de *P. Chrysogenum*	Biorreator com 12,5 L aerado e agitado	Aumento da taxa de transferência de oxigênio com aumento da fração de fase orgânica até 2%
JUNKER *et al.*, 1990	Absorção de oxigênio em sistema de perfluorocarboneto/ fase aquosa em um cultivo de *C. lipolytica, A. pasteuria-nus e G. oxydans*	Biorreator com 6,5 L aerado e agitado	Aumento da taxa de consumo de oxigênio com a adição de 75% de PFC
ROLS *et al.*, 1990	Absorção de oxigênio em sistema de *n*-dodecano/ fase aquosa em um cultivo de *S. cerevisiae*	Biorreator com 12 L aerado e agitado	Aumento do k_La com adição de *n*-dodecano
VAN DER MEER *et al.*, 1992	Absorção de oxigênio em sistema de *n*-octano/ fase aquosa em um cultivo de *P. oleovorans*	Biorreator aerado e agitado	Aumento da transferência de massa gás-líquido com aumento da fração de fase orgânica
ELIBOL e MAVITUNA, 1996	Absorção de oxigênio em sistema de perfluorocarboneto/ fase aquosa em um cultivo de *S. coelicolor*	Biorreator com 2 L aerado e agitado	Maior taxa de absorção de oxigênio e área interfacial PFC-fase aquosa com adição de PFC
JIA *et al.*, 1996	Absorção de oxigênio em sistema de alcanos/ fase aquosa num cultivo de *S. cerevisiae*	Biorreator em torre aerado	Aumento do k_La com adição de hidrocarboneto líquido
ELIBOL, 1999	Absorção de oxigênio em sistema de perfluorocarboneto/ fase aquosa em um cultivo de *S. cerevisiae*	Biorreator com 1 L aerado e agitado	Aumento do k_La com adição de PFC

Em fermentações com HCs ou PFCs a fase orgânica é dispersa na forma de gotas na fase aquosa e a tensão interfacial que atua na interface entre a fase orgânicas e a fase aquosa tende a manter uma forma esférica contra os estresses de cisalhamento que tendem a deformá-la. Essas gotas coalescem entre elas continuamente e sua distribuição de tamanhos depende da tensão interfacial, da fração volumétrica da fase orgânica e da intensidade da agitação. A distribuição de tamanhos das gotas é responsável pela área interfacial entre os dois líquidos e controla a transferência de substrato para as células (GUTIERREZ e ERICKSON, 1977). Essa transferência pode ocorrer através de adsorção direta das gotas hidrofóbicas à superfície celular ou pode ser mediada por um surfactante. No caso de adsorção direta, muitos mecanismos podem estar envolvidos, como interações hidrofóbicas, interações de Lewis (ácido ou base), interações eletrostáticas ou de van der Waals.

Para se estudar os mecanismos de interação entre as células e a fase hidrofóbica é necessário analisar as propriedades de superfície de ambos. Certamente, as propriedades de superfície dos microrganismos dependem da espécie e cepa utilizada, do ambiente que a cerca e da fonte de carbono presente no meio. Como a produção de agentes emulsionantes pelo microrganismo também pode interferir nas interações, é importante que se investigue a possível excreção de tais compostos no meio de cultivo.

Yarrowia lipolytica é uma levedura estritamente aeróbia e possui a capacidade de gerar produtos de grande interesse industrial, como lipases, ácido cítrico e proteínas. A literatura ainda reporta que essa espécie possui capacidade de produzir agentes emulsionantes. GUTIERREZ e ERICKSON (1977) observaram uma redução no diâmetro médio das gotas da fase orgânica paralelamente à redução da tensão interfacial durante a fermentação de hexadecano por *Candida lipolytica* e atribuíram o fenômeno à produção de agentes tensoativos pela levedura. De fato, CIRIGLIANO e CARMAN (1984) foram capazes de detectar e isolar atividade emulsionante, capaz de estabilizar emulsões água-óleo, no meio de fermentação de *C. lipolytica*. Atualmente, a utilização mais importante dessa levedura é a produção de lipases devido à ampla aplicabilidade desse produto.

As lipases são enzimas com elevado potencial biotecnológico, pois são capazes de catalisar inúmeras reações, não apenas a hidrólise de triacilgliceróis, mas também reações de síntese reversa (esterificação, transesterificação e interesterificação), gerando assim uma gama muito grande de aplicações em diversos setores industriais (OSÓRIO *et al*., 2001; ISO *et al*., 2001; GÜVENÇ *et al*., 2002). Dependendo de suas propriedades catalíticas, podem ser empregadas na indústria de detergentes, na indústria de processamento de óleo, na indústria farmacêutica, na indústria de polpa e papel, na produção de biodiesel e no tratamento de resíduos industriais.

É possível encontrar na literatura diversos trabalhos que reportam a dependência da produção de lipases microbianas com a concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo (CHEN *et al*., 1999; GULATI *et al*., 2000; ALONSO, 2001), além de já ter sido comprovada a utilização benéfica de PFC na produção dessa enzima (ELIBOL e OZER, 2000; AMARAL, 2003). No entanto, a verdadeira causa desse efeito ainda não existe na literatura; pergunta esta a ser respondida visando possibilitar uma melhoria na produtividade dessa enzima.

Portanto, o trabalho aqui apresentado vem contribuir, principalmente, para os processos biológicos que dependem da concentração de oxigênio dissolvido no meio líquido e vem colaborar para o avanço do uso de perfluorocarbonetos na biotecnologia, criando a perspectiva de realização de outras pesquisas de interesse industrial. Mais ainda, procurou-se através deste estudo contribuir para a elucidação dos mecanismos existentes nos sistemas que apresentam duas ou mais fases líquidas, caracterizando a superfície de alguns microrganismos e a produção de biosurfactantes, o que beneficia as operações realizadas em reatores multifásicos.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal da presente tese reside no emprego de perfluorodecalina, um perfluorocarboneto (PFC) utilizado como carreador de oxigênio em meios de cultivo, na produção de lipase de Yarrowia lipolytica em biorreator multifásico visando melhorar a transferência de massa e otimizar a respectiva produtividade.

Os objetivos específicos são:

- Estudo preliminar do cultivo de *Y. lipolytica* em frascos de *Erlenmeyer* agitados com meio de cultivo contendo glicose como fonte de carbono e na presença de perfluorodecalina, avaliando sua influência na produção de lipase;
- Caracterização preliminar da lipase produzida na presença de perfluorodecalina;
- Caracterização da superfície celular de *Y. lipolytica* através de técnicas propostas na literatura visando elucidar a afinidade pela perfluorodecalina;
- Análise da interação entre as células e a perfluorodecalina investigando a produção de bioemulsionantes por *Y. lipolytica* em meio YPD (glicose, peptona e extrato de lêvedo), na presença e ausência de perfluorodecalina;
- Avaliação da capacidade de transferência de oxigênio de um biorreator de bancada (2 L) agitado e aerado, identificando as melhores condições operacionais;
- Estudo dos mecanismos envolvidos na transferência de oxigênio em sistemas multifásicos através do impacto da presença de uma segunda fase líquida no valor do coeficiente de transferência de oxigênio (k_La);
- Investigação da cinética de crescimento de *Y. lipolytica* e produção de lipase em biorreator, nas condições indicadas pelo estudo da capacidade de transferência de oxigênio do equipamento, analisando a influência do valor de k_La na produção de lipase.

Como forma de embasamento aos objetivos propostos nesse trabalho, o Capítulo 3 apresenta uma revisão bibliográfica, procurando fornecer o embasamento teórico bem como os resultados obtidos na literatura referentes ao tema deste estudo. O Capítulo 4 apresenta os materiais e métodos utilizados para alcançar os objetivos propostos. Posteriormente, os Capítulos 5 a 10 relatam os resultados obtidos bem como as discussões pautadas na comparação dos dados existentes na literatura. Para finalizar, as

conclusões e as sugestões para trabalhos futuros são apresentadas nos Capítulos 11 e 12, respectivamente.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Perfluorocarbonetos (PFC's)

Os Perfluorocarbonetos (PFC's) foram sintetizados primeiramente durante a IIª Guerra Mundial devido à procura por materiais que fossem resistentes ao ataque de compostos que continham urânio, que são altamente reativos e eram produzidos para confecção da bomba atômica (LOWE *et al.*, 1998). Apesar de o alvo inicial ter sido a indústria bélica, os PFC's tiveram, posteriormente, suas aplicações ampliadas para outras áreas trazendo enormes benefícios, como será visto a seguir. Os PFC's não devem ser confundidos com os clorofluorocarbonetos (CFC's) que são altamente voláteis e persistentes no meio ambiente, o que faz com que sejam envolvidos na destruição da camada de ozônio da Terra.

3.1.1. Conceito

Perfluorocarbonetos (PFC's) são moléculas que tiveram todos os seus átomos de hidrogênio substituídos por flúor. Essa substituição progressiva do hidrogênio pelo flúor leva a um aumento da sua massa molecular, fazendo com que os PFC's líquidos sejam mais pesados que os óleos minerais, por exemplo, e tenham, aproximadamente, o dobro da densidade da água. Um composto bastante usado, perfluorodecalina ($C_{10}F_{18}$), é um alcano bicíclico perfluorinado, enquanto que o perfluoro-octil brometo ($C_8F_{17}Br$) é uma molécula linear com um átomo de bromo residual, como mostra a Figura 3.1 (LOWE *et al.*, 1998).

Devido à presença das fortes ligações carbono-flúor (aproximadamente 487 KJ/ mol) e da proteção estérica e eletrônica que os átomos de flúor conferem no esqueleto de carbono básico, os PFC's têm altas estabilidades química e térmica e são líquidos imiscíveis com os sistemas aquosos. Além disso, tem sido provado que esses compostos são inertes biologicamente, sem toxicidade frente a sistemas biológicos (LOWE, 2002).

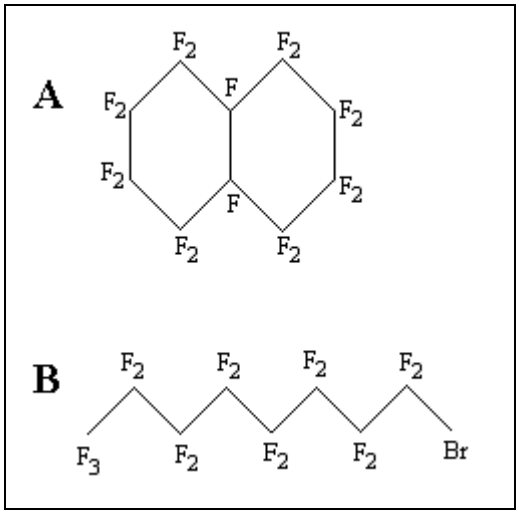

Figura 3.1. Estruturas químicas de perfluorocarbonetos: (A) perfluorodecalina, um PFC cíclico; (B) perfluoro-octil brometo, um PFC linear (Fonte: LOWE et al., 1998).

Uma das principais propriedades dos PFC's líquidos é que eles podem dissolver grandes volumes de oxigênio e gás carbônico, como pode ser observado na Tabela 3.1. Esta solubilidade encontra-se relacionada com o volume molecular do gás a ser dissolvido e aumenta linearmente com a pressão parcial, aproximando-se da lei de Henry. Esse fato contrasta com a clássica relação sigmoidal existente entre o conteúdo de oxigênio e a sua pressão parcial nos sistemas naturais de respiração hemoglobina-dependentes. Acredita-se que as moléculas gasosas ocupem "cavidades moleculares" presentes nos PFC's líquidos sem ocorrência de reações químicas. Deste modo, a liberação do oxigênio da molécula de perfluorocarboneto ocorre mais rapidamente que sua respectiva dissociação da molécula de hemoglobina (LOWE *et al.*, 1998).

Tabela 3.1. Solubilidades do oxigênio e do dióxido de carbono em PFC's líquidos (mmol.L^{-1} à pressão e temperatura padrões) (LOWE et al., 1998).

Líquido	Oxigênio	Dióxido de Carbono
Água	2,2	57
Perfluorotributilamina	35,2	123
Perfluorodecalina	35,5	125
Bis(perfluorohexil)eteno	37,9	159
Perfluorotripropilamina	39,6	146
Perfluoro-octil brometo	44,0	185
Bis(perfluorobutil)eteno	44,0	203

3.1.2. Aplicações

As propriedades singulares dos PFC's atraíram a atenção de muitos pesquisadores durante as últimas quatro décadas. LOWE *et al*. (1998) reportaram em sua revisão que um dos primeiros estudos com PFC na área biológica foi um trabalho de CLARK e GOLLAN (1966), que submergiram pequenos mamíferos (ratos) em fluor-butil-tetrahidrofurano, e estes foram capazes de "respirar".

Nessa mesma linha, trabalhos posteriores reportaram o uso de PFC's como fluidos carreadores de ar para aplicações intravasculares e respiratórias (os chamados "substitutos do sangue") e para preservação de órgãos humanos e de animais a serem transplantados (MATSUMOTO e KURODA, 2002).

Em um cultivo de protoplastos de plantas (células vegetais sem parede celular), na interface formada entre perfluorodecalina e o meio aquoso contendo nutrientes, o uso do PFC saturado com oxigênio aumentou a divisão mitótica e a regeneração da parede celular (WARDROP *et al*., 1997a). De uma outra forma, o PFC enriquecido com CO_2 aumentou a reprodução de um cultivo de *Rosa chinesis* (WARDROP *et al*., 1997b).

O cultivo de células animais também tem se beneficiado com as propriedades dos PFC's, principalmente devido a maior fragilidade dessas células. A alta densidade celular nos cultivos de hibridoma (10^7 – 10^9 cél.mL^{-1}) traz sérios problemas de limitação de oxigênio e acúmulo de gases resultantes do metabolismo, como o CO_2. Além disso, células animais são muito sensíveis ao cisalhamento, sendo necessário utilizar velocidade de agitação baixa para não danificá-las. CHO e WANG (1988) reportaram que o uso de PFC neste caso não prejudicou as células e aumentou o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) do sistema.

Uma aplicação interessante dos PFC's tem sido o uso para preservação de espermatozóides, como os exemplos citados na revisão de LOWE *et al*. (1998): PFC's saturados com oxigênio foram capazes de estender o período de estocagem de esperma de peru (THURSTON *et al*., 1993) e de peixe (McNIVEN *et al*., 1993).

No contexto da tecnologia de fermentações microbianas, os PFC's têm proporcionado grandes avanços, principalmente, devido à carência de oxigênio dissolvido em cultivos submersos. Como esse é um tema de interesse do presente trabalho, os principais resultados existentes na literatura, as vantagens e outros aspectos interessantes serão abordados separadamente no item a seguir.

3.1.2.1. PFC's na Bioengenharia Microbiana

PFC's têm grande valor tanto nos sistemas de culturas celulares eucariotas como procariotas regulando o suprimento de ar ou oxigênio, conduzindo a um crescimento celular sustentado e, em muitos casos, a um aumento na bioprodutividade. O uso de PFC's nesse sentido pode diminuir os danos mecânicos causados pela aeração convencional ou agitação contínua.

Outra vantagem da utilização destes compostos em sistemas de cultivos celulares é a possibilidade de recuperação e, portanto, reciclo deste material já que os PFC's líquidos são mais pesados e imiscíveis em meio aquoso (LOWE, 2002). Esse fato permite que seu uso rotineiro seja uma opção comercialmente viável. Além disso, podem ser utilizados em cultivos que necessitam de esterilização, pois podem ser autoclavados.

Perfluorocarbonetos têm sido explorados em sistemas bacterianos (DAMIANO e WANG, 1985), em cultivos de fungos filamentosos (ELIBOL e MAVITUNA, 1995; ELIBOL e MAVITUNA, 1996), e de leveduras (JUNKER *et al.*, 1990; ELIBOL, 1997) para promover uma melhora na transferência de oxigênio sob condições de fermentação. Além disso, também têm sido usados para remover oxigênio em cultivos de algas, como foi descrito por WASANASATHIAN e PENG (2001) que obtiveram maior rendimento em biomassa de *Chlorella vulgaris* com a adição de PFC em um fotobiorreator.

Um estudo em biorreator, utilizando a bactéria *Escherichia coli* resultou em um aumento de seis vezes na concentração celular, em comparação com o controle, quando perfluorometildecalina era continuamente borrifada através do meio de cultura e reciclada depois de coalescer no fundo do reator (DAMIANO e WANG, 1985). Embora esse resultado tenha sido bastante estimulante, CHANDLER *et al.* (1987) observaram inibição do crescimento celular deste mesmo microrganismo quando trabalharam com uma formulação comercial (Fluosol – DA) contento, essencialmente, PFC's, um emulsionante (Pluronic F – 68) e fosfolipídios. No entanto, eles concluíram que a toxicidade da emulsão de PFC pode ser atribuída à mistura do surfactante com os fosfolipídios. Portanto, o uso de formulações de PFC's deve ser examinado com cuidado devido aos possíveis efeitos tóxicos de alguns componentes.

A utilização de PFC também foi testada por ELIBOL (1997) em culturas de células de *Saccharomyces cerevisiae*. Concentrações de 10 e 15% (v/v) de perfluorodecalina, apesar de terem aumentado a fase lag de crescimento, foram capazes de diminuir a fase exponencial, reduzindo o tempo de obtenção da máxima concentração celular. Tal concentração obtida foi, aproximadamente, 1,7 vezes (para adição de 15% (v/v) de PFC) e 1,5 vezes (para adição de 10% (v/v) de PFC) maior em

comparação com o cultivo sem PFC. CHANDLER *et al*. (1987) e ELIBOL (1999) observaram que a utilização de PFC emulsionado não foi benéfica para os cultivos de *S. cerevisiae*, provavelmente devido ao efeito tóxico do emulsionante, como foi sugerido para *E. coli* (CHANDLER *et al*., 1987).

ELIBOL e MAVITUNA (1995) descreveram o uso de perfluorodecalina como um carreador de oxigênio em culturas de *Streptomyces coelicolor*, um actinomiceto que sintetiza o antibiótico actinorodina. Os resultados em frascos de 500 mL, agitados a 200 rpm, mostraram que a taxa específica de crescimento e a excreção do antibiótico aumentaram significativamente com o aumento do percentual de PFC até 50% (v/v). Em concentrações maiores, os resultados foram próximos do controle (sem PFC) sugerindo que uma inversão de fases, de uma dispersão de PFC em água para água dispersa em perfluorodecalina, tenha prejudicado os resultados.

Em contraste com os demais resultados citados até então para outros microrganismos, *S. coelicolor* mostrou ser resistente à presença do emulsionante Pluronic na concentração de 4 $g.L^{-1}$. A produção de actinorodina não foi afetada pela adição isolada deste composto, e quando adicionado junto com PFC, a produção do antibiótico dobrou em relação ao PFC puro (ELIBOL e MAVITUNA, 1995).

Resultados similares foram obtidos com *S. coelicolor* imobilizado, sendo a produção de actinorodina aumentada com o aumento da concentração de PFC em até 40% (v/v) e com a adição do PFC emulsificado com Pluronic. Embora tenha se detectado um pequeno número de células livres no cultivo, possivelmente devido à perturbação da matriz causada pelas gotas de PFC, a integridade da imobilização não foi afetada (ELIBOL e MAVITUNA, 1996).

Nesta mesma linha de pesquisa, o aumento de escala de Erlenmeyers de 500 mL para biorreatores de 2 e 20 L aerados não alterou o efeito benéfico do PFC na produção de actinorodina, sendo identificado um aumento de 3 vezes para biorreatores de 2 L e 2 vezes para biorreatores de 20 L com a adição de 10% (v/v) de PFC em relação ao controle (sem PFC) (ELIBOL e MAVITUNA, 1999).

Cultivos de *Candida lipolytica* e *Acetobacter pasteurianus* foram conduzidos por JUNKER *et al*. (1990) em um biorreator de 6,5 L aerado e agitado a 600 rpm. A fase exponencial de crescimento de *A. pasteurianus* aumentou de 4 horas para 9,5 horas e a concentração máxima de células obtida aumentou cinco vezes com a adição de 75% (v/v) de PFC no cultivo. Essa mesma concentração de PFC provocou um aumento na concentração máxima de células de *C. lipolytica* de 30 $g.L^{-1}$ para 145 $g.L^{-1}$.

Observações em microscópio revelaram uma mudança notável na morfologia de células de *S. coelicolor* de grandes e densos *pellets* para pequenas estruturas de hifas

com o aumento da concentração de PFC (ELIBOL e MAVITUNA, 1995). No entanto, ELIBOL (1997) não detectou mudanças significativas na morfologia celular de *Saccharomyces cerevisiae* na presença de PFC emulsificado.

Grande parte dos trabalhos aqui citados (ELIBOL, 1997; ELIBOL e MAVITUNA, 1995; ELIBOL e MAVITUNA, 1996; ELIBOL e MAVITUNA, 1999) menciona o aumento na taxa de consumo de glicose (substrato) com a adição dos PFC's, o que pode ser atribuído à melhora na transferência de oxigênio. Portanto, as células são capazes de aproveitar o suprimento adicional de oxigênio e, assim, metabolizar mais facilmente a glicose.

AMARAL (2003) estudou o efeito da adição de 10 e 20% (v/v) de PFC no cultivo de *Y. lipolytica* em frascos agitados, para produção de lipase, obtendo um aumento de 24 vezes na produtividade da enzima com a adição de 20% de PFC. Este resultado incentivou o aperfeiçoamento do processo, através do aumento de escala para um biorreator agitado e aerado e uma investigação mais aprofundada dos mecanismos de transferência de oxigênio deste sistema, que foram realizadas no presente trabalho.

Os efeitos benéficos dos PFC's podem ser atribuídos, provavelmente, à mudança na dinâmica da transferência de oxigênio quando se adiciona uma fase líquida mais permeável ao oxigênio no meio aquoso, que apresenta baixa solubilidade de gases. Portanto, é necessário que se compreendam os mecanismos de transferência de massa envolvidos nesses sistemas multifásicos para que se possam ajustar as condições operacionais. Assim sendo, o próximo item apresenta uma revisão sobre a transferência de massa em sistemas multifásicos.

3.2. Transferência de Massa em Sistemas Multifásicos

Nos estudos dos sistemas multifásicos o termo "fase dispersa" ou "segunda fase líquida" é usado para representar a fase líquida orgânica, que se encontra dispersa na fase aquosa. Para fase líquida aquosa, o termo "fase contínua" será utilizado, pois é comumente encontrado em artigos e livros (DUMONT e DELMAS, 2003).

A literatura apresenta um grande número de trabalhos que mostram que a conversão de reações químicas de sistemas gás-líquido, limitados pela transferência de massa, pode ser aumentada significativamente pela adição de uma segunda fase líquida dispersa que apresenta alta solubilidade do soluto (ALPER *et al.*, 1980; BRUINING *et al.*, 1986; ROLS *et al.*, 1990; JUNKER *et al.*, 1990; VAN EDE *et al.*, 1995). Os carreadores de oxigênio, como os PFC's e hidrocarbonetos, têm sido bastante usados

com esse intuito (HO *et al.*, 1990; JU *et al.*, 1991; ELIBOL e MAVITUNA, 1999; ELIBOL, 1999).

O atual trabalho tem como tema a transferência de oxigênio em biossistemas multifásicos. Portanto, a presente revisão terá maior enfoque na transferência desse soluto nos sistemas biológicos.

A transferência de oxigênio em sistemas gás-líquido-líquido é definida tendo como base a taxa de absorção em sistemas gás-líquido, sendo abordada uma breve revisão sobre esse aspecto no próximo item para posterior entendimento da transferência de oxigênio no sistema trifásico.

3.2.1. Transferência de Massa em Biossistemas gás-líquido

Genericamente, a variação da concentração do oxigênio dissolvido em um reator aeróbio é descrita pela equação de balanço de massa:

$$\frac{dC_L}{dt} = TTO - TCO \tag{3.1}$$

sendo, C_L a concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida, t o tempo, TTO a taxa de transferência de oxigênio e TCO a taxa de consumo de oxigênio.

Enquanto a TTO para o meio exceder a TCO pelas células e mais nenhum nutriente for limitante, o crescimento celular prossegue a uma taxa exponencial.

A TCO pelas células depende da densidade celular (X) e da taxa específica de consumo de oxigênio (q_{O2}), como indicado na Eq. (3.2):

$$TCO = q_{O2} * X \tag{3.2}$$

A uma concentração celular crítica, o oxigênio pode deixar de ser fornecido ao meio de forma suficientemente rápida. Nestas condições, o oxigênio torna-se o nutriente limitante para o crescimento celular, sendo responsável por baixas densidades celulares e por reduzidas produtividades (JUNKER *et al.*, 1990).

Em relação à TTO em biorreatores tem-se, na maioria dos casos, a transferência de oxigênio da bolha de ar até as organelas dos microrganismos. O caminho do

substrato gasoso da bolha de ar para a organela pode ser dividido em vários passos (Figura 3.2) como se segue (BAILEY E OLLIS, 1986):

1) Transferência do seio da fase gasosa para uma camada de gás, relativamente, estagnada;
2) Difusão através da camada de gás, relativamente estagnada;
3) Difusão através da camada líquida, relativamente estagnada, ao redor da bolha;
4) Transferência da camada líquida, relativamente estagnada para a fase *bulk* do líquido;
5) Transferência do seio da fase líquida para a camada líquida, relativamente estagnada, ao redor do microrganismo;
6) Difusão através da camada líquida, relativamente estagnada;
7) Difusão da superfície do microrganismo para uma organela na qual o oxigênio é consumido;

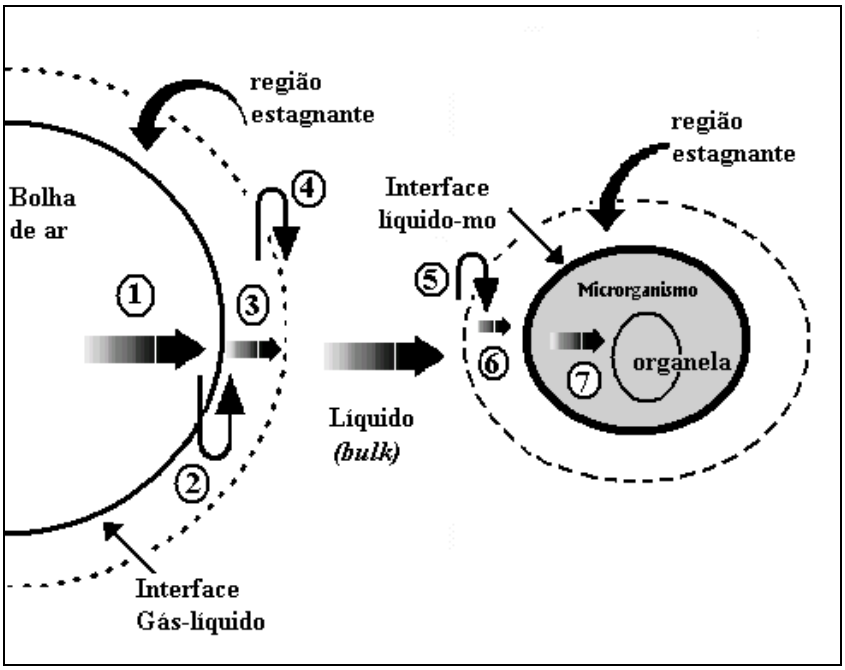

Figura 3.2. Diagrama esquemático dos passos envolvidos no transporte de oxigênio da bolha de ar para o interior do microrganismo (figura reproduzida de SHMIDELL *et al.* (2001)).

Os passos 3 e 5, onde ocorre a difusão através das camadas líquidas relativamente estagnadas ao redor da bolha e do microrganismo, são os passos mais lentos entre os demais mencionados, e como resultado, controlam a taxa de

transferência global. A agitação e a aeração aumentam a taxa de transferência de massa nesses passos e aumentam a área interfacial do gás e do líquido.

Tendo em vista as diminutas dimensões das células, assim como a enorme área exposta ao meio líquido, a resistência 5 pode ser desprezada. Portanto, a transferência de massa em biossistemas gás-líquido se dá, principalmente, nas proximidades de uma interface gás-líquido.

Vários modelos têm sido propostos para descrever a transferência de massa através da camada limite. A teoria da dupla resistência, desenvolvida por LEWIS e WHITMAN (1924) descreve que a transferência de massa interfacial está confinada em dois filmes finos estagnados nos dois lados da interface gás-líquido e nenhuma na interface, como mostra a Figura 3.3, para o caso da transferência de oxigênio do ar para o líquido.

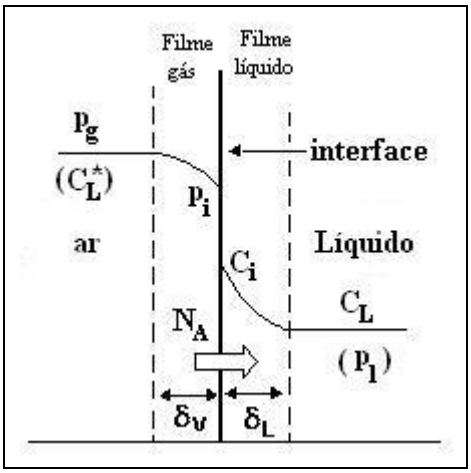

Figura 3.3. Transferência de oxigênio interfacial: perfis de concentração de oxigênio através dos dois filmes finos estagnados nos dois lados da interface gás-líquido.

Segundo o modelo, para transferência de oxigênio, existem duas resistências à transferência de oxigênio da fase gasosa (ar) para a fase líquida: uma no filme gasoso, de espessura δ_V e outra no filme líquido, de espessura δ_L. Na fase gasosa, a pressão parcial do oxigênio no seio da fase gasosa (p_g) decresce para p_i na interface (atm). Na fase líquida, a concentração de oxigênio dissolvido começa com C_i na interface e decresce para C_L no seio da fase líquida ($gO_2\ m^{-3}$). Os fluxos de oxigênio por unidade de área local ($gO_2\ m^{-2}\ h^{-1}$) na fase gasosa ($N_{O2,G}$) e na fase líquida ($N_{O2,L}$) são descritos como (HINES e MADDOX, 1985):

Fase gasosa: $$N_{O2,G} = k_G * \left(p_g - p_i\right) \quad (3.3)$$

Fase líquida: $N_{O2,L} = k_L * (C_i - C_S)$ (3.4)

onde, k_G (gO_2 m^{-2} h^{-1} atm^{-1}) e k_L (m s^{-1}) são os coeficientes de transferência de oxigênio locais da fase gasosa e líquida, respectivamente.

Em soluções aquosas diluídas, assume-se que as concentrações na interface estão em estado estacionário e que, portanto, p_i e C_i e estão em equilíbrio termodinâmico, podendo ser relacionadas pela *lei de Henry* (HINES e MADDOX, 1985):

$$p_i = H * c_i \tag{3.5}$$

onde H é a constante de *Henry* (atm m^3 gO_2^{-1}).

Como as concentrações na interface não podem ser medidas diretamente, especifica-se o fluxo global de oxigênio da bolha de ar para a fase líquida através de um coeficiente global de transferência de oxigênio (K_L) multiplicado pela força motriz na fase líquida:

$$N_{O2} = K_L * (C_L^* - C_L) \tag{3.6}$$

onde C_L* (g m^{-3}) é a concentração de saturação do oxigênio na fase líquida em equilíbrio com a pressão parcial do mesmo na fase gasosa (p_g):

$$C_L^* = \frac{p_g}{H} \tag{3.7}$$

A concentração de saturação do oxigênio no líquido em equilíbrio com a fase gás (C_L*) é dada pela solubilidade do oxigênio na fase líquida, que depende da temperatura, como mostra a Tabela 3.2 (BAILEY E OLLIS, 1986).

Tabela 3.2. Solubilidade do oxigênio em água pura a 1 atm (BAILEY E OLLIS, 1986).

Temperatura (ºC)	Solubilidade do Oxigênio (mmol L^{-1})
0	2,18
10	1,70
15	1,54
20	1,38
25	1,26
30	1,16

No estado estacionário, $N_{O2,G} = N_{O2,L} = N_{O2}$, e inserindo as Eqs. (3.5) e (3.7) na Eq. (3.3), tem-se que:

$$\frac{1}{K_L} = \frac{1}{H * k_G} + \frac{1}{k_L} \tag{3.8}$$

Como k_G é muito maior do que k_L devido a baixa resistência do oxigênio na fase gasosa, o coeficiente global de transferência de oxigênio (K_L) é, aproximadamente, igual ao coeficiente local (k_L). Este é o motivo pelo qual encontra-se na literatura, comumente, a notação k_L (k em letra minúscula) para definir o coeficiente global de transferência de oxigênio. Portanto, no presente trabalho será adotada tal notação, ou seja, k_L como o coeficiente global de transferência de oxigênio.

Tendo em vista que o fluxo de oxigênio está definido por unidade de área interfacial de troca de massa, área essa de difícil quantificação quando se tem um enorme número de bolhas suspensas em um líquido, pode-se definir:

$$a = \frac{\textit{área interfacial de transferência de massa } (m^2)}{\textit{volume total de líquido } (m^3)}$$

Desta forma, para a taxa de transferência de oxigênio, pode-se escrever:

$$\mathrm{TTO} = \frac{d\mathrm{C_L}}{dt} = \mathrm{N_{O2}} * a = k_L * a * \left(\mathrm{C_L^*} - \mathrm{C_L}\right) \tag{3.9}$$

onde, N_{O2}*a (ou TTO) é a taxa de transferência de oxigênio (gO_2 m^{-3} h^{-1}), a é a área interfacial específica gás-líquido. Define-se, portanto, $k_L * a$ ou, k_La, como sendo o coeficiente volumétrico global de transferência de oxigênio.

Quando se trabalha com uma segunda fase líquida na presença de células, quatro fases estão presentes no fermentador: a fase gasosa (ar), uma fase orgânica líquida, uma solução aquosa e os microrganismos (fase sólida). Novas áreas interfaciais irão existir e a transferência de oxigênio da bolha de ar para as células pode seguir cinco rotas, como mostra a Figura 3.4 (ROLS *et al.*, 1990).

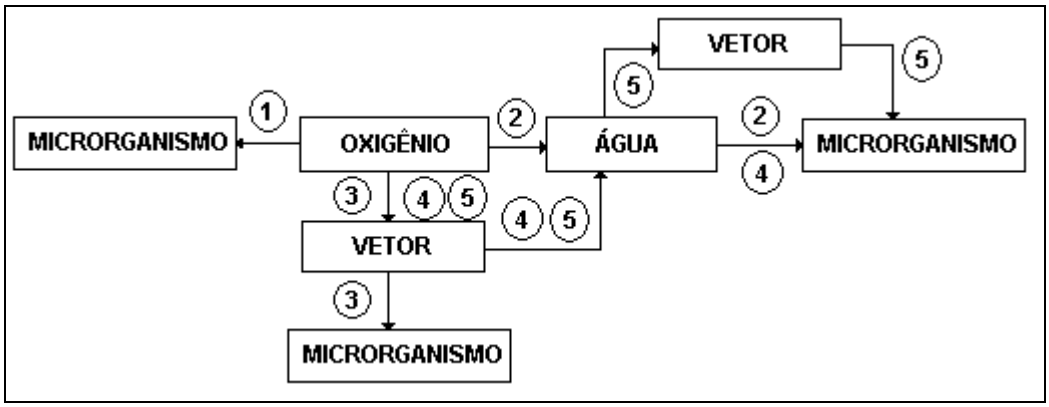

Figura 3.4. Possíveis rotas (1, 2, 3, 4 ou 5) para a transferência de oxigênio de bolhas de ar para os microrganismos na presença de um vetor de oxigênio (segunda fase líquida). (ROLS *et al.*, 1990).

Portanto, quando uma fase líquida orgânica é adicionada à mistura gás-líquido, o sistema se torna mais heterogêneo e complexo. Conseqüentemente, deve-se ter cuidado em aplicar as teorias criadas para os sistemas bifásicos em sistemas de três fases gás-líquido-líquido. A presença de uma fase orgânica no meio de cultivo aquoso, onde estão presentes nutrientes e células, obviamente, torna o sistema ainda mais complicado do ponto de vista de transferência de oxigênio.

3.2.2. Os Mecanismos de Transferência de Massa nos Sistemas Multifásicos

Existem três abordagens que são referenciadas na maioria dos trabalhos para explicar a mudança na transferência de massa em sistemas gás-líquido-líquido (DUMONT e DELMAS, 2003):

1. O contato direto gás-líquido (fase dispersa) formando um complexo entre a fase gás e a fase orgânica;
2. O efeito transportador (*shuttle effect*) das gotas da fase dispersa, carregando o soluto gasoso da interface gás-líquido para o seio da fase líquida;
3. A interação dinâmica das gotas da fase dispersa com a camada limite de concentração causando um aumento na turbulência ou mistura nessa camada.

Através dessas abordagens, alguns mecanismos foram propostos, como os que são apresentados a seguir.

3.2.2.1. O Mecanismo do Complexo Fase gás-Fase orgânica

ROLS *et al*. (1990) propuseram um mecanismo de transferência de massa na presença de uma segunda fase líquida através de observações visuais estáticas das interações gás-fase aquosa-fase orgânica (*n*-dodecano). Tais observações os levaram a crer na possibilidade de o aumento da transferência de massa, com a adição de uma fase dispersa, ser decorrente da formação de uma camada dessa fase como um filme fino na interface gás-líquido, como mostra a Figura 3.5.

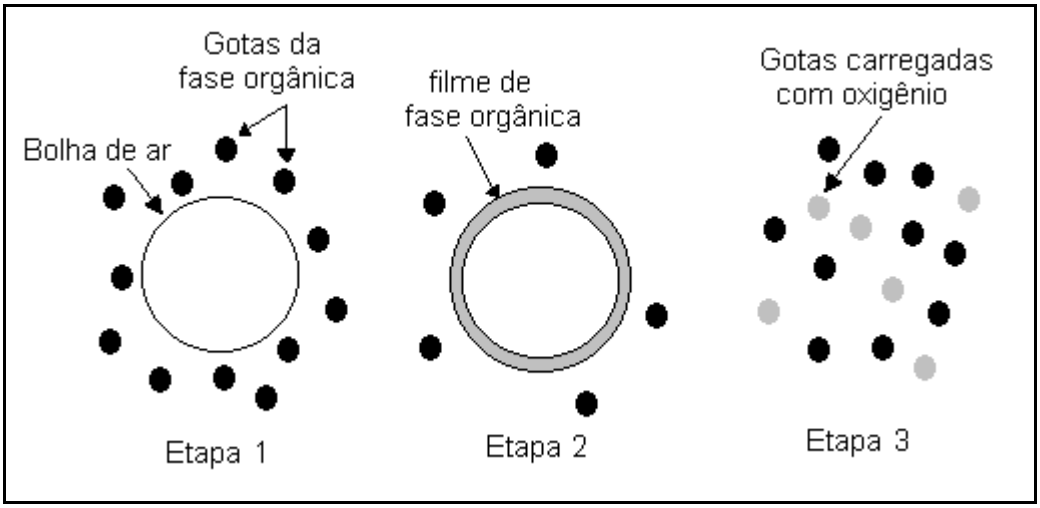

Figura 3.5. Esquema do mecanismo do complexo fase gasosa-fase orgânica (figura reproduzida de ROLS *et al.*, 1991).

Este mecanismo requer a coalescência entre bolha de ar e a gota da fase orgânica (Figura 3.5, etapa 1) seguida pela coalescência da gota da fase orgânica e do filme de fase orgânica. O fenômeno da coalescência resulta da presença de instabilidades hidrodinâmicas devido a colisões entre as bolhas de ar e as gotas da fase dispersa, que criam ondas na camada limite líquida. A idéia básica desse modelo é que quando uma bolha submerge na emulsão, o líquido orgânico cobre a superfície da bolha de ar e o filme formado é carregado com oxigênio (Figura 3.5, etapa 3) (ROLS *et al*., 1991).

3.2.2.2. O Mecanismo de transporte

Segundo o mecanismo de transporte, as partículas caminham freqüentemente entre a interface gás-líquido e o seio do líquido, que é a zona estagnada de líquido (de acordo com a teoria do filme). Devido à absorção preferencial do componente da fase gasosa nas partículas dispersas de líquido, a concentração desse componente na fase líquida nas proximidades da interface é reduzida, levando a um aumento na taxa de absorção devido ao aumento no gradiente de concentração. Após um determinado tempo de contato, a partícula volta para o seio do líquido onde o componente, que está se difundindo, é dessorvido devido a diferença de concentração local e a partícula é regenerada (ALPER *et al*., 1980).

Este mecanismo requer que as partículas da fase dispersa sejam menores do que a espessura do filme líquido estagnado. Para a absorção de gás em meio aquoso agitado intensivamente, um valor típico para a espessura do filme estagnado é de aproximadamente 10 - 20 μm, enquanto que para aparatos de laboratório, esse valor fica em torno de 100 - 300 μm (BRILMAN *et al.*, 2000).

ALPER *et al*. (1980) mostraram que a partir de um determinado percentual da fase dispersa, a taxa de transferência de massa não aumenta mais, o que pode ser explicado em termos do modelo do filme, pois de acordo com o mecanismo de transporte, a espessura efetiva do filme líquido será reduzida com o aumento da taxa de absorção, como pode ser observado na Figura 3.6. Portanto, após uma determinada concentração, a espessura efetiva do filme será do tamanho das partículas da fase dispersa, o que não irá permitir um maior aumento na taxa de transferência de massa através desse filme.

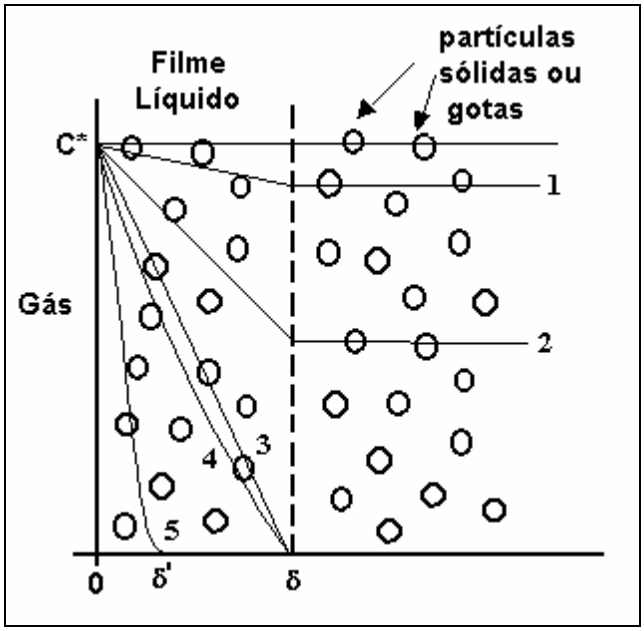

Figura 3.6. Concentração do componente gasoso na fase líquida em diferentes concentrações da fase dispersa (da menor (1) a maior (5)) (figura reproduzida de ALPER *et al.*, 1980).

3.2.3. Parâmetros Influenciados pela Presença da Fase Líquida Dispersa

Como já foi visto nos itens anteriores, a adição de uma fase líquida dispersa modifica a taxa de transferência do soluto gasoso através da camada limite líquida em torno da bolha de ar. Propriedades físicas (densidade, viscosidade, solubilidade gasosa e difusividade gasosa) da mistura líquida são modificadas e as características gás-líquido (distribuição de gotas no interior da camada limite, possíveis caminhos para a transferência de massa, coeficiente de transferência de massa e área interfacial gás-líquido) podem também ser modificadas devido a propriedades interfaciais do líquido disperso (DUMONT e DELMAS, 2003).

Os itens a seguir irão enfocar os principais parâmetros modificados pela adição de uma fase líquida dispersa.

3.2.3.1. O Coeficiente Volumétrico de Transferência de Oxigênio (k_La)

A quantidade de oxigênio transferida através de uma interface gás-líquido é dependente do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La, h^{-1}) e da força motriz devido à diferença entre a concentração de oxigênio dissolvido e as condições de saturação, segundo a Eq. (3.9), apresentada anteriormente.

O k_La é comumente usado para caracterizar a taxa de absorção de gás em reatores multifásicos e muitos autores já reportaram investigações sobre o efeito da adição de uma fase dispersa no valor desse parâmetro (ELIBOL e MAVITUNA, 1999; ELIBOL, 1997; CHO e WANG, 1988; ROLS *et al.*, 1990).

Em sistemas gás-líquido-líquido, a presença da fase orgânica imiscível, que tem alta afinidade pelo soluto gasoso, deve ser levada em conta na determinação de k_La. Embora os mecanismos de transferência de oxigênio ainda não estejam completamente confirmados e compreendidos, grande parte dos trabalhos reportados na literatura utiliza o coeficiente global de transferência de oxigênio, obtido através de técnicas tradicionais (RIET, 1979), como o método da desgaseificação (ELIBOL e MAVITUNA, 1999; ELIBOL, 1997; CHO e WANG, 1988) ou o método do balanço gasoso (ROLS *et al.*, 1990), para avaliar o efeito da adição de uma segunda fase líquida e os resultados obtidos mostram o aumento desse parâmetro nesses sistemas multifásicos.

JUNKER *et al.* (1990) utilizaram moléculas fluorescentes (*fluoróforos*) para medir a concentração de oxigênio dissolvido na fase aquosa e na fase do PFC separadamente, diferente dos eletrodos convencionais que medem a concentração de oxigênio dissolvido no seio das duas fases líquidas misturadas. O perfil encontrado para os valores de $(k_La)_{GW}$ (coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio do ar para a água) e $(k_La)_{GP}$ (coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio do ar para o PFC) foram similares, havendo diminuição do k_La com o aumento da concentração de PFC até 55% (v/v) e em seguida um aumento súbito de k_La com o aumento da concentração de PFC de 55% (v/v) para 100% (v/v).

Em cultivos de células animais, que são sensíveis à tensão cisalhante, a adição de PFC aumentou o valor de k_La em 2 a 5 vezes, mesmo com vazões de ar baixas (60 mL/min) (CHO e WANG, 1988).

ROLS *et al.* (1990) demonstraram que o uso de um carreador de oxigênio (*n*-dodecano) no cultivo de *Aerobacter aerogenes* resultou no aumento de 3,5 vezes no valor de k_La. No entanto, para concentrações do carreador maiores que 23% (v/v) não se observou aumento, mas sim um leve decréscimo. ELIBOL e MAVITUNA (1996) trabalhando com um cultivo de *S. coelicolor* também detectaram o efeito benéfico do PFC no valor de k_La apenas em concentrações de PFC até 20% (v/v). JIA *et al.* (1997) observaram o mesmo comportamento quando trabalharam com *n*-dodecano e PFC em biorreatores do tipo *air-lift*. Diferentes vazões de ar também resultaram em picos de k_La quando variou-se a concentração (v/v) de hidrocarbonetos líquidos em biorreatores em torre (JIA *et al.*, 1996). Esses resultados mostram uma mesma tendência e estes efeitos ocorreram, provavelmente, devido a mudanças no comportamento reológico do sistema, já que a inclusão de mais de 20% (v/v) de PFC causou um aumento visível na

viscosidade do meio (ELIBOL e MAVITUNA, 1999), o que já havia sido medido por JU *et al*. (1991).

A presença de *n*-dodecano disperso mecanicamente no meio de cultivo aquoso de *A. aerogenes* provocou um aumento no valor de k_La de 3,5 vezes, enquanto que o hidrocarboneto disperso através de tratamento ultrasônico, aumentou o mesmo parâmetro em 5,4 vezes. Esses resultados demonstram que o tamanho das gotas da fase dispersa (40 μm, obtido com agitação mecânica e 1 μm, para o tratamento com ultra-som), ou seja, a área superficial dessa fase influencia no processo de transferência de oxigênio (ROLS *et al*., 1990). Resultados similares foram obtidos por ELIBOL (1999) utilizando Pluronic para emulsionar o PFC, o que dispersou as gotas do vetor de oxigênio com maior eficiência.

3.2.3.2. A Área Interfacial Específica gás-líquido

Os efeitos da adição de uma segunda fase líquida na área interfacial específica gás-líquido (*a*) parecem ser bastante complexos e difíceis de prever dado que as propriedades do sistema têm um profundo efeito em *a* (DUMONT e DELMAS, 2003).

ROLS *et al*. (1990) mediram o tamanho da bolha de ar pelo método fotográfico e concluíram que o diâmetro médio de *Sauter* reduziu 15% com a adição de *n*-dodecano e a área interfacial gás-líquido aumentou proporcionalmente. No entanto, MACMILLAN e WANG (1987 *apud* ROLS *et al*., 1990), usando o mesmo método, concluíram que *a* não variou com o aumento da concentração da fase orgânica.

DAS *et al*. (1985) observaram que a presença da fase orgânica na dispersão gás-líquido influencia a área interfacial de maneira mais complexa. Com o aumento da fração de fase orgânica, a área interfacial aumenta inicialmente, passa por um máximo e depois diminui. A redução inicial no diâmetro da bolha com o aumento da concentração da fase orgânica seria devido à redução da coalescência das bolhas pela presença da fase orgânica, enquanto que um maior aumento da concentração da fase orgânica, reduz o nível de turbulência, evitando a dispersão das bolhas.

Apesar de se imaginar que a adição da fase orgânica exerce influência nas propriedades interfaciais e, portanto, na transferência de massa, os resultados da literatura ainda são controversos para se chegar a alguma conclusão.

3.2.3.3. O Coeficiente Global de Transferência de Oxigênio (k_L)

ROLS *et al.* (1990) estimaram os valores de k_L entre a fase orgânica e a água ($(k_L)_{OW}$) e entre a fase gasosa e a água ($(k_L)_{GW}$) para *n*-dodecano e furano. Os dois sistemas apresentaram valores muito próximos para k_L, indicando que a resistência à transferência de oxigênio do sistema água-fase dispersa está localizada na camada limite aquosa e é controlada pela fase aquosa.

As gotas da fase orgânica podem interagir com a camada limite na interface gás-líquido e, assim, aumentar o coeficiente global de transferência de massa (k_L) pelo aumento da turbulência ou agitação na camada limite. No entanto, há uma grande dificuldade de se realizar investigações dos efeitos hidrodinâmicos no aumento da transferência de massa (DUMONT e DELMAS, 2003).

A existência dos efeitos hidrodinâmicos gerados pelas gotas da fase dispersa foi sugerido por HANSSAN e ROBINSON (1977) para explicar o aumento de k_La com a adição de *n*-dodecano e *n*-hexadecano. No entanto, DUMONT e DELMAS (2003) reportaram em sua revisão que não foi encontrado nenhum resultado na literatura mostrando o aumento em k_L devido à adição de uma segunda fase líquida. Portanto, é pouco provável que o aumento da transferência de massa ocorra devido à efeitos hidrodinâmicos das gotas da fase orgânica.

3.2.3.4. A Concentração de Oxigênio Dissolvido

A medida da concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida é geralmente realizada através de eletrodos. No caso dos sistemas contendo uma segunda fase líquida, a grande questão é se o eletrodo está medindo a concentração de oxigênio dissolvido na fase aquosa ou na fase orgânica. ELIBOL e MAVITUNA (1997) mediram o aumento da concentração de oxigênio dissolvido em sistemas contendo 10, 20, 40, 50 e 70% PFC (v/v), que foram aerados depois de se zerar a concentração de oxigênio pela introdução de nitrogênio, como mostra a Figura 3.7. O tempo de resposta diminuiu com o aumento da concentração de PFC até 40%. No entanto, um aumento abrupto foi obtido com concentrações de PFC superiores a essa, sugerindo que houve uma mudança na fase detectada pelo eletrodo, quando a fase orgânica passou a não ser mais a fase dispersa e sim a fase contínua. Portanto, os autores concluíram que em concentrações de PFC abaixo de 40%, o eletrodo detecta a concentração de oxigênio na fase aquosa.

A maioria dos trabalhos reportados na literatura que investigaram a concentração de oxigênio dissolvido em sistemas contendo uma segunda fase líquida dispersa mostra

um aumento na menor concentração de oxigênio dissolvido atingida em fermentações aeróbicas, em que há consumo de oxigênio durante o processo (ELIBOL, 1997; ELIBOL e MAVITUNA, 1999; JIA *et al.*, 1996; JIA *et al.*, 1997). Além disso, os resultados desses trabalhos apresentam aumento de produtividade (de células e metabólitos) com essa elevação na concentração de oxigênio dissolvido.

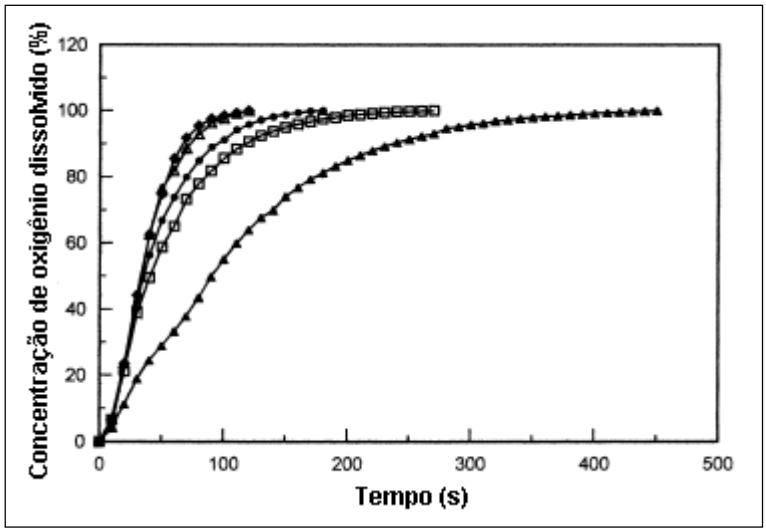

Figura 3.7. Curvas de resposta de oxigênio dissolvido em diferentes concentrações de PFC (resultado reproduzido de ELIBOL e MAVITUNA, 1997). (PFC % (v/v): •10, □20, ▲40, △50, ♦70).

Com base nestes conceitos sobre a transferência de massa em sistemas multifásicos pode-se dizer que os mecanismos que governam a transferência de massa nesses sistemas ainda não estão completamente compreendidos apesar da literatura fornecer possibilidades e resultados bastante coerentes. Investigações experimentais apresentam variações nos resultados relacionados com o aumento da transferência de massa nesses sistemas. A comparação entre esses resultados é dificultada pelo fato de haver uma variedade de sistemas gás-líquido-líquido e um grande número de parâmetros diferentes. É possível observar ainda muitos resultados controversos apresentados na literatura principalmente em relação às interações entre a fase gás, a fase dispersa, e a fase contínua, o que demonstra que investigações no que se refere ao comportamento de tais sistemas são essencialmente necessárias. Além disso, ainda são obscuros os efeitos dos parâmetros k_L e a separadamente, que certamente exercem influência sobre a transferência de massa nos sistemas multifásicos.

3.3. *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica é um microrganismo estritamente aeróbio, eucariótico, do reino Fungi, pertencente à classe dos Ascomicetos, subclasse Hemiascomicetos, anteriormente conhecida como *Candida lipolytica*. Foi originalmente classificada como *Candida lipolytica* e depois reclassificada como *Endomycopsis lipolytica*, *Saccharomycopsis lipolytica* e, finalmente, *Yarrowia lipolytica* (BARTH e GAILLARDIN, 1997).

Essa levedura é bastante diferente dos modelos celulares mais estudados *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* (consideradas leveduras "convencionais") em relação à fisiologia, genética e biologia molecular e, portanto, pertence ao grupo das leveduras "não-convencionais", sendo a espécie mais estudada desse grupo (BARTH e GAILLARDIN, 1997).

Como não é considerada patogênica, já foi utilizada em aplicações industriais como na produção de proteínas de microrganismos unicelulares, *flavour* de pêssego e ácido cítrico, em processos considerados pela *American Food and Drug Administration* como GRAS (*Generally Regarded As Safe*) (TSUGAWA *et al.*, 1969). Além disso, excreta várias enzimas, como proteases, lipases, esterases e fosfatases, todas de grande interesse biotecnológico (NICAUD *et al.*, 2002). Recentemente, a seqüência total dos seis cromossomos de *Y. lipolytica* foi determinada (DUJON *et al.*, 2004), permitindo sua admissão nos estudos de genoma, transcriptoma e proteoma. Existe ainda um campo que vem sendo explorado com as leveduras não convencionais para pesquisa básica e também para aplicações biomédicas, que é a produção de proteínas heterólogas. Historicamente, *Saccharomyces cerevisiae* foi usada como hospedeiro para produção de proteínas heterólogas, uma levedura sobre a qual a literatura já acumulou um grande conhecimento, mas que apresenta, neste caso, baixa produtividade, uma estabilidade de plasmídeo pobre e baixa capacidade de excreção (MADZAK *et al.*, 2004). MULLER *et al.* (1998) testaram quatro leveduras não convencionais e *S. cerevisiae* na produção de seis enzimas fúngicas e todas as não convencionais foram mais eficientes que a levedura convencional, sendo que *Y. lipolytica* foi o hospedeiro que apresentou melhor performance e reprodutibilidade.

Na maioria das leveduras "não-convencionais", como *Y. lipolytica*, em contraste com *S. cerevisiae*, a respiração em presença de oxigênio é essencial para o uso de açúcares e sendo aeróbio restrito, *Y. lipolytica* não tem sua taxa de respiração, seu conteúdo de citocromos ou propriedades mitocondriais afetados por altas concentrações de glicose (FLORES *et al.*, 2000; ANDREISHCHEVA *et al.*, 1997).

KAWASSE (2001) em sua revisão mencionou a importância do conhecimento da regulação do metabolismo de glicogênio para monitorar e controlar as condições de cultura de leveduras utilizadas em biotecnologia. Um decréscimo na amplitude das oscilações do reciclo de glicogênio foi o resultado obtido por KAWASSE (2001) quando aplicou estresse oxidativo na fase exponencial de crescimento de células de *Y. lipolytica*. O autor também observou o decréscimo do conteúdo de glicogênio intracelular nessas condições, concomitantemente com a redução da atividade lipolítica intracelular e aumento da atividade extracelular. Para o experimento que não foi submetido ao estresse, o conteúdo de glicogênio se manteve oscilando em torno de um valor constante e as atividades lipolíticas intra e extracelular não variaram. Esses resultados sugerem que uma possível interação entre a lipase e o glicogênio, o que já foi observado *in vivo e in vitro* (PEREIRA-MEIRELLES, 1997), tenha influenciado a excreção da enzima.

O efeito da concentração de oxigênio dissolvido no crescimento de uma cepa de *Yarrowia lipolytica,* em meio de cultivo contendo glicose, foi reportado por KAMZOLOVA *et al*. (2003). Detectou-se um aumento de 2,8 para 6,9 $g.L^{-1}$ na concentração celular com o aumento de 5% a 60% da saturação de oxigênio dissolvido. O aumento da concentração de oxigênio não provocou esse efeito apenas no crescimento celular, mas também na produção de um metabólito, o ácido cítrico.

A gama de substratos utilizados por *Yarrowia lipolytica* inclui alcanos, ácidos graxos, ácidos orgânicos, proteínas e alguns açúcares (principalmente glicose). Apesar de alguns trabalhos terem reportado a inclusão de sacarose nessa gama de substratos (NICAUD *et al.*, 1989), algumas cepas não apresentam atividade invertásica detectável (PEREIRA-MEIRELLES *et al.*, 1997).

Algumas espécies de leveduras exibem dimorfismo, ou seja, a habilidade de alternar, reversivelmente, entre duas formas morfológicas: células ovóides e hifas bastante alongadas. *Yarrowia lipolytica* é um fungo que apresenta dimorfismo naturalmente, formando células de leveduras, pseudo-hifas e hifas septadas (BARTH e GAILLARDIN, 1997).

Esse fenômeno atrai muita atenção devido à possibilidade de sua ligação à virulência de vários fungos patogênicos importantes, incluindo *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum* e *Crytococcus neoformans.* A caracterização das condições que regulam a morfogênese e diferenciação das células pode levar a importantes descobertas de novos remédios ou tratamentos efetivos contra leveduras patogênicas (SZABO e ŠTOFANÍKOVÁ, 2002). Apesar da espécie *Y. lipolytica* ser considerada uma levedura não patogênica, é um modelo adequado para o estudo de dimorfismo, pois

é uma espécie suscetível à manipulação genética e apresenta fácil distinção entre as formas morfológicas (JIMÉNEZ-BREMONT *et al.*, 2001).

Embora existam vários mecanismos envolvidos na regulação do dimorfismo, a limitação do nitrogênio parece ser um dos sinais mais importantes envolvidos no processo. A formação de pseudo-hifas em *Saccharomyces cerevisiae* tem sido identificada como uma resposta à limitação de nitrogênio (GIMENO *et al.*, 1992). Em contraste com *S. cerevisiae*, SZABO (1999) apresentou resultados mostrando que a formação de hifas em culturas de *Yarrowia lipolytica* foi inibida pela limitação de nitrogênio, enquanto que a fonte de carbono, aparentemente não foi importante para a formação de filamentos.

Condições que favorecem a fermentação (ou que inibem a respiração), como a concentração de glicose, a anaerobiose ou a adição de inibidores da cadeia de transferência de elétrons, fosforilação oxidativa, assim como a inibição da síntese de proteínas mitocondriais bloqueiam a formação de hifas em *Mucor* spp (FRIEDENTHAL *et al.*, 1974 *apud* SZABO, 1999). O mesmo resultado foi obtido por SZABO (1999), que aplicou Antimicina A, um inibidor da transferência de elétrons da coenzima Q reduzida para o complexo III (citocromo-c redutase), em culturas de *Y. lipolytica*, indicando que o processo de conversão de energia e o metabolismo de carbono podem estar envolvidos na formação de filamentos.

SZABO (1999) mostrou que o pH do meio afeta fortemente a morfologia de células de *Yarrowia lipolytica*, mas apenas na presença de uma fonte de nitrogênio complexa, sugerindo que as células respondem mais a alterações nutritivas do meio com diferentes valores de pH do que ao próprio valor de pH. Num estudo posterior, SZABO e ŠTOFANÍKOVÁ (2002) comprovaram a importância da presença de fontes de nitrogênio orgânico no efeito do pH na morfologia celular de *Y. lipolytica*.

KAWASSE *et al.* (2003) estudaram a aplicação de estresse térmico (degrau de temperatura de 29ºC para 37ºC) e oxidativo (adição de peróxido de hidrogênio até concentrações de 1 M) em um cultivo de células de *Yarrowia lipolytica*. Através de processamento digital de imagens foi comprovado que ambas condições de estresse fizeram com que as células de leveduras apresentassem um maior crescimento na forma de hifas.

3.3.1. Consumo de Substratos Hidrofóbicos e a Superfície Celular

A levedura *Y. lipolytica* é geralmente isolada de meios contendo fonte de carbono lipídica, tais como ambientes poluídos, como a Baía de Guanabara (HAEGLER

e MENDONÇA-HAEGLER, 2001), laticínios, flora de queijos picantes (BARTH e GAILLARDIN, 1997), produtos avícolas crus (ISMAIL *et al.*, 2001), e é particularmente adaptada a substratos hidrofóbicos.

Acredita-se que, evolutivamente, microrganismos que vivem em meios aquosos onde a fonte de carbono é hidrofóbica e, portanto, se encontra dispersa no meio, sob a forma de gotas, tenham desenvolvido mecanismos para facilitar o acesso a esse substrato devido à pequena probabilidade de contato das gotas de óleo, em constante movimento, com os microrganismos.

O contato direto entre as gotas de óleo e as células parece ser o mecanismo pelo qual a maior parte do substrato é transportada (ERICKSON *et al.*, 1975). Observações em microscópio mostram a adesão de gotas de metil ricionelato na superfície das células de *Y. lipolytica* (AGUEDO *et al.*, 2003; 2004), como pode-se observar na Figura 3.8. A área de contato entre o microrganismo e o substrato inclui tanto as grandes gotas de substrato onde o microrganismo se adere como as pequenas gotas que são adsorvidas na superfície celular (GUTIERREZ e ERICKSON, 1977).

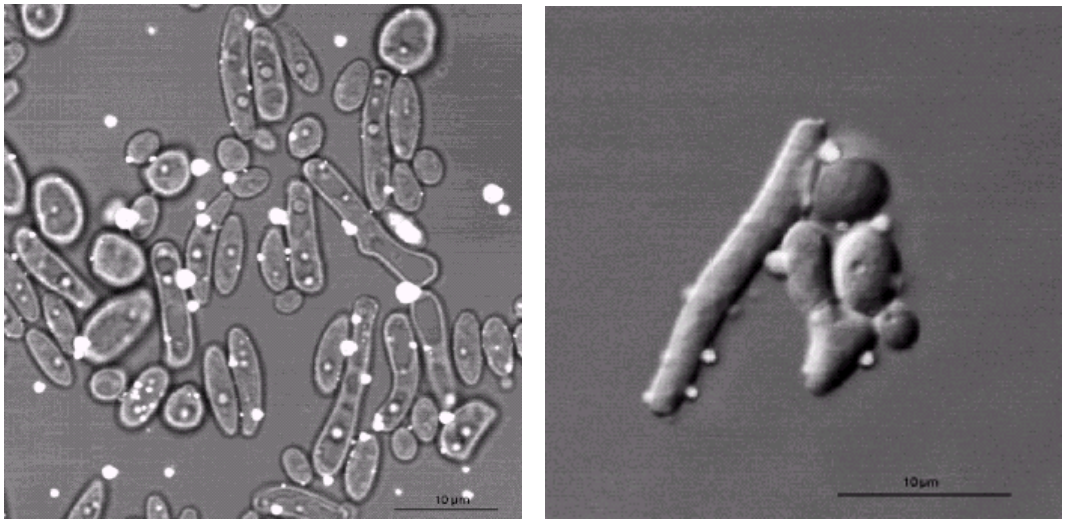

Figura 3.8. Observações em microscópio de *Y. lipolytica* cultivadas em metil ricionelato. As gotas da fase oleosa são adsorvidas na superfície das células (imagens obtidas por AGUEDO *et al.*, 2003; 2004) .

Testes de afinidade foram realizados com *S. cerevisiae* e uma levedura assimiladora de hidrocarboneto, *Candida tropicalis*. Essas leveduras foram colocadas separadamente em um meio contendo hexadecano e após agitação intensa e centrifugação, todo o hexadecano foi recuperado do meio contendo *S. cerevisiae* e para *C. tropicalis* encontrou-se uma relação linear entre o conteúdo de hexadecano que ficou aderido na célula e a quantidade de células presente no ensaio (KAEPPELI e FIECHTER, 1976). Nesse mesmo trabalho, não foi observada nenhuma influência da

temperatura nem do pH na quantidade de hexadecano que ficou aderido às células, mostrando não haver nenhuma reação enzimática envolvida no processo de adesão. Entretanto, a mudança na fonte de carbono para um substrato hidrofílico, glicose, reduziu a capacidade à adsorção, mostrando que a afinidade do microrganismo ao hidrocarboneto é parcialmente induzida. Com os resultados obtidos, KAEPPELI e FIECHTER (1976) acreditaram que a afinidade entre a superfície das células e o substrato estaria baseada em uma camada lipofílica na superfície celular. Os autores conseguiram, ainda, isolar uma fração lipopolisacarídica após degradação enzimática da parede celular da levedura.

Em fermentações com hidrocarbonetos, a fase oleosa é dispersa em forma de gotas na fase aquosa e a tensão interfacial que atua entre a fase oleosa e a fase aquosa tende a manter as gotas na forma esférica contra os estresses de cisalhamento que tendem a deformá-la. Essas gotas coalescem entre elas continuamente e sua distribuição de tamanhos depende da tensão interfacial, da fração volumétrica de hidrocarboneto e da intensidade de agitação. A distribuição de tamanhos das gotas é responsável pela área interfacial entre os dois líquidos e controla a transferência de substrato para as células. GUTIERREZ e ERICKSON (1977) observaram uma redução no diâmetro médio das gotas da fase oleosa paralelamente à redução da tensão interfacial durante a fermentação de hexadecano por *Candida lipolytica* e atribuíram o fenômeno à produção de agentes tensoativos pela levedura. De fato, CIRIGLIANO e CARMAN (1984) foram capazes de detectar e isolar atividade emulsionante, capaz de estabilizar emulsões água-óleo, no meio de fermentação de *C. lipolytica*. Esse bioemulsionante, que foi chamado de *liposan*, era composto de aproximadamente 83% de carboidrato e 17% de proteína, apresentando atividade emulsionante maior que alguns emulsionantes comerciais como: goma arábica, alginato e caseína (CIRIGLIANO e CARMAN, 1985).

Portanto, a assimilação de substratos hidrofóbicos pode ocorrer através de adsorção direta das gotas hidrofóbicas à superfície celular ou pode ser mediada por um surfactante.

No caso de adsorção direta, muitos mecanismos podem estar envolvidos, como interações hidrofóbicas, interações de *Lewis* (ácido ou base), interações eletrostáticas ou de *van der Waals*. Alguns testes têm sido desenvolvidos para caracterizar propriedades hidrofóbicas (MATH, *microbial adhesion to hydrocarbons,* adesão microbiana a hidrocarbonetos) (ROSENBREG, 1991) ou propriedades doadoras ou aceptoras de elétrons (ácido-base de Lewis) (MATS, *microbial adhesion to solvents*, adesão microbiana a solventes) (BELLON-FONTAINE *et al*., 1996) dos microrganismos. Esses testes e alguns outros (VAN DER MEI *et al*., 1995) dão informações sobre as

propriedades da superfície das células e podem ser úteis para prever o comportamento microbiano frente a uma superfície.

AGUEDO *et al*. (2003) investigaram as propriedades da superfície de *Y. lipolytica* pelo teste *MATS* e observaram um maior caráter doador e aceptor de elétrons nos cultivos realizados na presença de substrato hidrofóbico (metil ricionelato) do que na presença de glicose, mostrando que o metil ricionelato não induz um aumento no caráter hidrofóbico da superfície celular, mas influencia suas propriedades ácido-base. Os autores ainda desenvolveram um teste citométrico baseado na coloração dupla fluorescente *in situ* das gotas de metil ricionelato com um fluorocromo e, das células, com o calcofluor. Depois de coradas as células e as gotas de óleo, foi possível realizar microscopia de fluorescência, como mostra a Figura 3.9, que possibilitou a quantificação das células que interagem com as gotas de óleo. Esse método pareceu para os autores mais conveniente devido a sua simplicidade, rapidez, ausência de interferentes e devido à possibilidade de realizar as medições nas condições de cultivo.

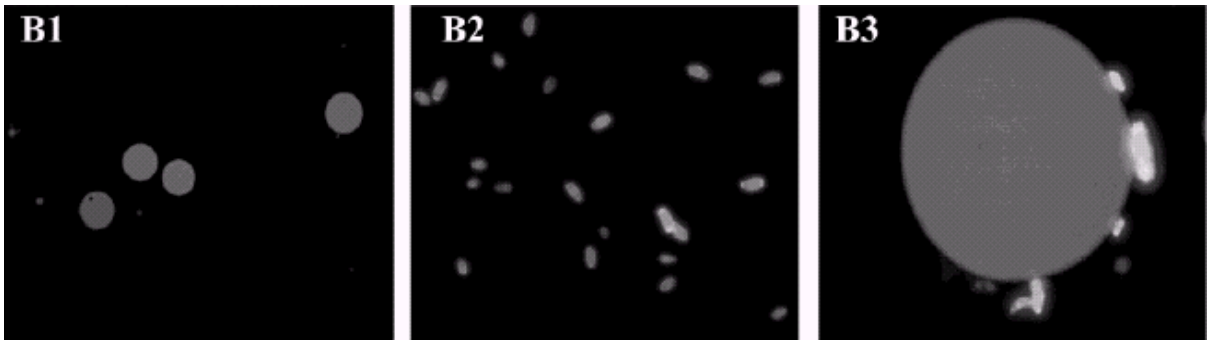

Figura 3.9. Observações em microscopia de fluorescência obtidas com a análise citométrica de um cultivo de *Y. lipolytica*. (B1) gotas de metil ricionelato coradas com vermelho do Nilo, (B2) células de levedura coradas com calcofluor e (B3) células de levedura na superfície (AGUEDO *et al*., 2003).

AGUEDO *et al*. (2004) estudaram a influência de surfactantes nas propriedades da superfície das células de *Y. lipolytica* e encontraram resultados controversos, como o aumento da hidrofobicidade com a adição de Tween 80 e redução do percentual de adesão à decano com a adição de saponina e Triton X-100.

Quando a adesão à substratos hodrofóbicos ocorre devido a produção de um surfactante pela própria levedura, geralmente, a fonte de carbono presente no meio de cultivo influencia bastante na produção de tal biosurfactante. A literatura aponta uma ampla diversidade entre as fontes de carbono que induzem a excreção de biosurfactantes. PAREILLEUX (1979) isolou compostos tenso-ativos a partir da levedura *Candida lipolytica* em meio contendo *n*-alcanos como fonte de carbono, mas quando a cepa foi cultivada em meio contendo glicose não se detectou biemulsionante

no meio de cultivo. Em um estudo similar, ZINJARDE e PANT (2002) mostraram que não há biossíntese de surfactante em meio de cultivo de *Y. lipolytica* NCIM 3589 utilizando como fonte de carbono substratos solúveis (glicose, glicerol, acetato de sódio e álcool), somente em meio contendo óleo cru e alcanos (C_{10} – C_{18}). CIRIGLIANO e CARMAM (1984) mostraram que a levedura *Y. lipolytica* produz biossurfactantes a partir de diferentes fontes de carbono tais como: hexadecano, parafina, óleo de soja, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de algodão, sendo que com hexadecano detectou-se maior produção. Em 2001, SARRUBO *et al.* (2001) produziram biossurfactante utilizando glicose como fonte de carbono no meio de cultivo de *C. lipolytica* IA 1055, apresentando alta atividade de emulsificação. Estes autores mostraram, de acordo com os resultados obtidos, que não é necessário a presença de hidrocarbonetos para indução da biossíntese de surfactantes. SARUBBO *et al.* (2007) otimizaram as condições de produção do biossurfactante por *C. lipolytica* em meio contendo óleo de canola (100 g/L) e glicose (100 g/L). O biossurfactante produzido foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de 71 mN/m para valores em torno de 30 mN/m.

Certamente, as propriedades de superfície das leveduras e a produção de biosurfactantes dependem da espécie e cepa utilizada, do ambiente que a cerca e da fonte de carbono presente no meio. Muita informação nesse sentido ainda está faltando na literatura, principalmente em relação às interações entre o microrganismo e as gotas de compostos hidrofóbicos, como os PFCs.

3.4. Produção de Lipase

A utilização de lipases vem se intensificando nos últimos anos, devido à versatilidade dessas enzimas. Esta característica vem do fato de que as lipases são capazes de catalisar inúmeras reações, não apenas a hidrólise de triacilgliceróis, mas também reações de síntese reversa (esterificação, transesterificação e interesterificação) (OSÓRIO *et al.*, 2001; ISO *et al.*, 2001; GÜVENÇ *et al.*, 2002), gerando assim uma gama muito grande de aplicações em diversos setores industriais.

Na indústria de alimentos, por exemplo, a lipase é utilizada principalmente para a produção de ácidos graxos, responsáveis pelo desenvolvimento do aroma e sabor, principalmente em queijos (AKIN *et al.*, 2003), e na modificação de lipídeos, aumentando seu valor comercial e nutritivo (OSÓRIO *et al.*, 2001; UNDURRAGA *et al.*, 2001).

As lipases têm aplicações promissoras na indústria de detergentes, removendo resíduos gordurosos ou até mesmo na síntese de biosurfactantes, substituindo parcial ou

totalmente os surfactantes, que causam grandes danos ao meio ambiente (HEMACHANDER e PUVANAKRISHNAN, 2000).

Uma das aplicações mais antigas das lipases é na indústria farmacêutica, que foi um dos setores que mais beneficiou o avanço dos estudos da utilização de lipases. A capacidade dessa enzima de catalisar reações de síntese ou hidrólise de ésteres, gerando produtos em excesso enanciomérico, pode ser útil na síntese de compostos opticamente ativos de interesse farmacêutico (OKAZAKI *et al.*, 1997).

Uma promissora aplicação das lipases reside na produção de Biodiesel. O Biodiesel (ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos) é um combustível biodegradável, não-tóxico, de combustão limpa, produzido a partir de fontes renováveis e, portanto, tem se tornado cada vez mais importante devido à redução das reservas de petróleo e a poluição causada por combustíveis fósseis (MARCHETTI *et al.*, 2007; HA *et al.*, 2007). A utilização de lipase como catalisador para a produção de biodiesel é vantajosa, principalmente, do ponto de vista ambiental e em relação às condições operacionais em comparação com os catalisadores químicos (ácidos e básicos). No entanto, o alto custo das lipases e os efeitos negativos para a enzima, de reagentes (metanol) e produtos (glicerol) da reação de transesterificação ainda mantêm essa tecnologia desvantajosa economicamente (MARCHETTI *et al.*, 2007). Novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas para contornar tais empecilhos (LI *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2006; HA *et al.*, 2007).

Esta enzima também encontra aplicações em vários outros setores industriais, como cosméticos e oleoquímica (SHARMA *et al.*, 2001). Até mesmo no tratamento de efluentes a atividade lipolítica tem sido aplicada com sucesso (SCIOLI e VOLLARO, 1997; JUNG *et al.*, 2002; ROSA *et al.*, 2006). A Tabela 3.3 apresenta um resumo das principais aplicações das lipases em alguns setores industriais.

Dada a importância das lipases, mais de 1000 artigos que enfocam assuntos relacionados a esta enzima são produzidos a cada ano (JAEGER e EGGERT, 2002) e atualmente, a literatura ainda reporta muitos estudos direcionados para a alteração do meio de produção de modo a otimizar a obtenção e a excreção de lipases (TAN *et al.*, 2003; BURKERT *et al.*, 2004; ELLAIAH *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2004). Antes de focalizar a atenção para investigações como estas, o próximo item irá abordar as características das lipases para, posteriormente, serem detalhados os parâmetros que influenciam a produção desta enzima.

Tabela 3.3. Aplicações industriais de lipases microbianas (Fonte: SHARMA *et al.*, 2001).

Indústria	Ação	Produto ou Aplicação
Detergentes	Hidrólise de gorduras	Remoção de resíduos oleosos de tecidos
Laticínios	Hidrólise de gordura do leite Maturação de queijo, Modificação de manteigas	Desenvolvimento de agentes *flavorizantes* no queijo, no leite e na manteiga
Panificação	Melhorar o *flavour*	Prolongar o tempo de prateleira
Bebidas	Melhorar o aroma	Bebidas
Alimentos	Melhora da qualidade	Maionese e molhos
Alimentos	Transesterificação	Alimentos Saudáveis
Carne e Peixe	Desenvolvimento de *flavour*	Remoção de Gordura
Óleos e Gorduras	Transesterificação; Hidrólise	Manteiga de cacau, margarina, ácidos graxos, glicerol, mono-, e diglicerídeos
Química	Seletividade enanciomérica	Blocos quirais e químicos
Farmacêutica	Transesterificação; Hidrólise	Lipídeos especiais, remédios para digestão
Cosméticos	Síntese	Emulsionantes e cremes
Couro	Hidrólise	Produtos de couro
Papel	Hidrólise	Papel com melhor qualidade
Limpeza	Hidrólise	Remoção de Gordura

3.4.1. Lipases

Lipases (triacilglicerol esteracilhidrolases E.C.3.1.1.3.) são esterases que catalisam a hidrólise de ligações éster de triacilgliceróis de cadeias longas de ácidos graxos, formando ácidos graxos livres, glicerol, diacilglicerol e monoacilglicerol. Essas enzimas podem ainda realizar a reação reversa, como é possível observar na Figura 3.10, quando submetidas a meios reacionais não-aquosos ou micro-aquosos, catalisando a síntese de vários ésteres.

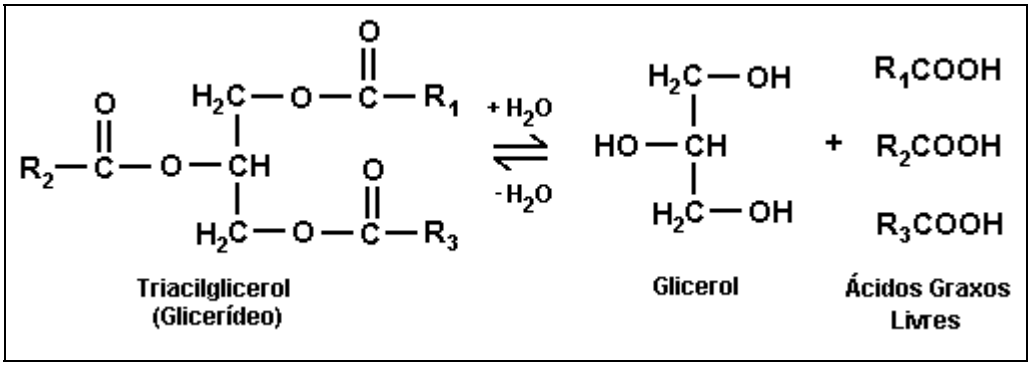

Figura 3.10. Reação catalisada pela lipase.

Essas enzimas atuam na interface água-óleo catalisando, preferencialmente, a hidrólise de ésteres de ácidos graxos insolúveis em água, o que as diferencia de outras esterases que agem sobre ésteres solúveis (WHITAKER, 1972). Existe, ainda, uma outra característica que vem sendo cogitada para diferenciar as lipases das demais esterases que é o fato de as lipases hidrolisarem triacilgliceróis com cadeia graxa maior ou igual a 10 carbonos, enquanto que as esterases teriam como substrato apenas triacilgliceróis contendo menos de 10 carbonos na cadeia graxa (JAEGER *et al.*, 1999). Entretanto, ainda há muita controvérsia sobre a definição correta e exata de lipases.

Os ácidos graxos que compõem os triacilgliceróis apresentam números de átomos de carbono variando de 3 a 18 e, além disso, podem, em alguns casos, apresentar insaturações. A proporção desses diferentes ácidos varia de gordura para gordura, como pode ser visto na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Composição de ácidos graxos em alguns óleos e gorduras (Fonte: MORRISON e BOYD, 1992).

Gordura ou Óleo	Ácidos Saturados %							Ácidos Insaturados %					
									Enóico			Dienóico	Trienóico
	C_8	C_{10}	C_{12}	C_{14}	C_{16}	C_{18}	$> C_{18}$	$< C_{16}$	C_{16}	C_{18}	$> C_{18}$	C_{18}	C_{18}
Gordura de carne			0,2	2-3	25-30	21-26	0,4-1	0,5	2-3	39-42	0,3	2	
Manteiga	1-2	2-3	1-4	8-13	25-32	8-13	0,4-2	1-2	2-5	22-29	0,2-1,5	3	
Coco	5-9	4-10	44-51	13-18	7-10	1-4				5-8	0-1	1-3	
Milho				0-2	8-10	1-4			1-2	30-50	0-2	34-56	
Semente de algodão				0-3	17-23	1-3				23-44	0-1	34-55	
Banha				1	25-30	12-16		0,2	2-5	41-51	2-3	3-8	
Oliva			0-1	0-2	7-20	1-3	0-1		1-3	53-86	0-3	4-22	
Palma				1-6	32-47	1-6				40-52		2-11	
Semente de palma	2-4	3-7	45-52	14-19	6-9	1-3	1-2		0-1	10-18		1-2	
Amendoim				0,5	6-11	3-6	5-10		1-2	39-66		17-38	
Soja				0,3	7-1	2-5	1-3		0-1	22-34		50-60	2-10

A diversidade de ácidos graxos e, conseqüentemente, de triglicerídeos presentes na natureza, propiciou a existência de vários tipos de lipases. Dependendo da origem ou da forma de obtenção, é possível obter lipases com características bastante distintas.

GUERZONI *et al.* (2001) investigaram a liberação de ácidos graxos devido a atuação das lipases de doze diferentes cepas de *Y. lipolytica* inoculadas em manteiga. O ácido oléico (C18:1) foi o principal ácido graxo liberado no meio pela maioria das cepas. No entanto, algumas cepas liberaram maior percentual de ácido linolênico (C18:2), esteárico (C18:0), margárico (C17:0) ou heptadecanóico (C17:1). A

variabilidade observada nesse grupo de cepas em relação aos ácidos graxos liberados demonstra a diversidade do padrão lipolítico das diferentes cepas de uma mesma espécie. Além disso, os autores também enfatizaram a influência das condições ambientais na expressão das lipases de uma mesma cepa, ou seja, específicas combinações de fatores geraram grandes diferenças nos ácidos graxos liberados pela ação de uma mesma cepa.

Além da diversidade de lipases existentes, as várias metodologias de dosagem de atividade lipolítica utilizadas tornam a comparação dos resultados complicada. Não existe um ensaio universal, mas a reação padrão mais comum para a determinação da atividade da lipase é a hidrólise de trioleína com a quantificação dos ácidos graxos liberados. Um dos métodos mais usados para acompanhar esta reação é a titulação (PELED e KRENZ, 1981). Quando não é utilizado um agente tensoativo, a determinação é muito demorada. Portanto, o uso de substratos solúveis em água, tais como o p-nitrofenil palmitato (WINKLER e STUCKMANN, 1979) é muitas vezes empregado, pois a hidrólise é rápida e pode ser acompanhada espectrofotometricamente. Esse método não é considerado muito adequado, pois estes substratos também podem ser hidrolisados por outras esterases. No entanto, PEREIRA-MEIRELLES *et al.* (1997) comparando três métodos distintos (difusão em placa, titulação de ácidos graxos liberados na hidrólise de óleo e hidrólise de p-nitrofenil laurato) encontraram perfis de atividade lipolítica muito semelhantes no meio de cultivo de *Y. lipolytica*, o que demonstrou que o método espectrofotométrico pode ser utilizado em alguns casos com confiança.

3.4.1.1. Principais Fontes de Lipases

As lipases podem ser encontradas em animais (pâncreas, plasma de sangue, saliva, suco pancreático), no leite, em vegetais (soja, amendoim, etc.), bactérias e fungos (WHITAKER, 1972). Nos eucariotas, as lipases estão envolvidas em vários estágios do metabolismo lipídico, incluindo a digestão de gorduras, o metabolismo de lipoproteínas, absorção e reconstituição. Nas plantas, as lipases são encontradas nos tecidos de reserva de gordura (SHARMA *et al.*, 2001).

Das fontes produtoras de lipases, as microbianas são as de maior interesse industrial por vários motivos, entre eles, a grande variedade de microrganismos produtores. Existem inclusive algumas lipases de origem microbiana que já são disponíveis comercialmente, como a lipase de *Candida rugosa* (JAEGER e REETZ, 1998), como pode ser visto na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Algumas lipases microbianas comercialmente disponíveis (Fonte: JAEGER e REETZ, 1998; VAKHLU e AVNEET, 2006).

Fonte	Aplicação	Companhia Produtora
Fungos		
Candida rugosa	Síntese orgânica	Amano, Biocatalysts, Boehringer, Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma
Candida antarctica	Síntese orgânica	Boehringer, Mannheim, Novo Nordisk
Thermomyces lanuginosus	Aditivo em detergente	Boehringer, Mannheim, Novo Nordisk
Rhizomucor miehei	Processamento de alimentos	Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano
Yarrowia lipolytica	Processamento de alimentos	Amano
Bactérias		
Burkholderia cepacia	Síntese orgânica	Amano, Fluka, Boehriner, Boehringer
Pseudomonas alcaligenes	Aditivo em detergente	Genencor
Pseudomonas mendocina	Síntese Orgânica	Genencor
Chromobacterium viscosum	Síntese Orgânica	Asahi, Biocatalysts

Adicionalmente, os microrganismos destacam-se por não serem sujeitos a efeitos sazonais, por possuírem pequeno tempo de geração, por serem de fácil manipulação genética e ainda por produzirem, na maioria dos casos, lipases extracelulares, de fácil obtenção (PEREIRA-MEIRELLES, 1997).

Os microrganismos produtores de lipases têm sido encontrados em diversos *habitats*, como em resíduos industriais, em fábricas que processam óleos vegetais, em indústrias de laticínios, em solos contaminados com óleo, em sementes que produzem óleo, em pilhas de compostagem, em alimentos em deterioração, entre outros (SZTAJER *et al.*, 1988; SHARMA *et al.*, 2001). Entre os microrganismos produtores estão as bactérias (JAEGER *et al.*, 1999), os fungos filamentosos (ELIBOL e OZER, 2002), as leveduras (MURALIDHAR *et al.*, 2001) e os actinomicetos (SZTAJER *et al.*, 1988).

Entre os microrganismos, as leveduras apresentam uma série de vantagens frente às outras fontes microbianas, como, por exemplo, menor tempo de geração do que os fungos filamentosos e melhor adaptação a longos tempos de processo. Além disso, são geneticamente mais estáveis do que as bactérias e possuem "GRAS status" (*Generally Regarded As Safe*), o que permite que os produtos obtidos por estes microrganismos sejam mais aceitos nos setores alimentício e farmacêutico (PEREIRA-MEIRELLES, 1997).

3.4.1.2. Características, Estrutura e Mecanismo de Catálise das Lipases

As lipases microbianas são glicoproteínas de peso molecular variando entre 19 e 60 kDa (JAEGER e REETZ, 1998), apresentando em torno de 258 e 544 resíduos de aminoácidos, dos quais um grande número são hidrofóbicos e responsáveis pela interação entre a enzima e substratos insolúveis em água.

As lipases exibem um padrão de dobramento característico, conhecido como dobra hidrolase α/β. O centro da lipase é composto por uma folha β central com até oito lâminas β ($\beta 1$ - $\beta 8$) conectadas por até seis α hélices (A – F), como pode ser visto na Figura 3.11. O sítio ativo das lipases é composto por uma tríade catalítica, sendo Serina-Asparagina-Histidina e Serina-Glutamina-Histidina as mais freqüentes (JAEGER e REETZ, 1998).

As estruturas tridimensionais (3D) das lipases do fungo *Rhizomucor miehei* e do pâncreas humano foram determinadas em 1990 (BRADY *et al.*, 1990; WINKLER *et al.*, 1990), o que levou a um melhor entendimento do mecanismo de catálise na interface substrato-fase aquosa.

Descobriu-se que o sítio ativo de algumas lipases é protegido estericamente por uma espécie de "tampa", formada por resíduos hidrofóbicos, que são deslocados ao entrar em contato com o substrato, expondo o sítio ativo (JÄÄSKEEÄINEN *et al.*, 1998). Quando essas lipases são submetidas a meios aquosos, o deslocamento dessa estrutura torna-se termodinamicamente desfavorável.

O movimento da estrutura que compõe a tampa confere às lipases pelo menos duas conformações distintas, sendo a primeira denominada "fechada" ou inativa pelo não deslocamento da "tampa" e a segunda denominada "aberta" ou ativa, pelo deslocamento da "tampa" na presença de substratos hidrofóbicos, como pode-se observar na Figura 3.12.

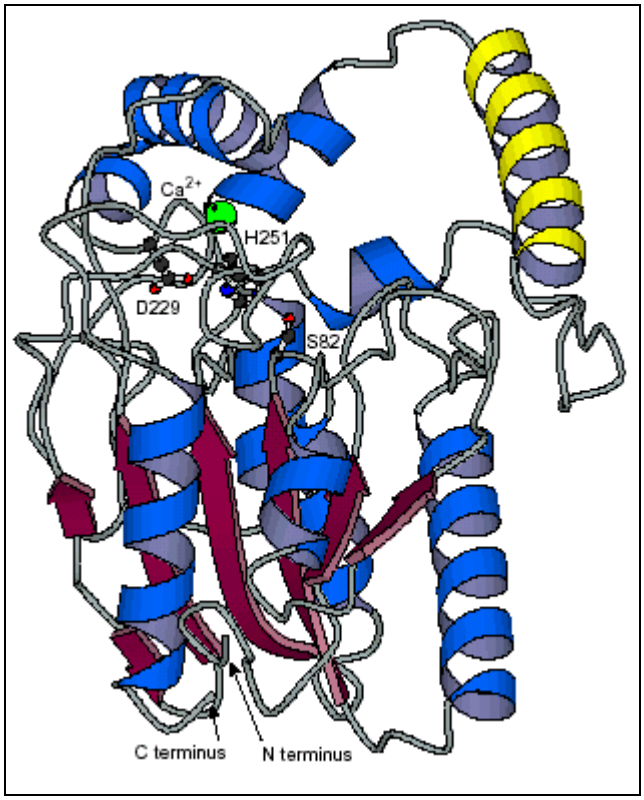

Figura 3.11. A estrutura da lipase de *Pseudomonas aeruginosa*. As lâminas beta estão representadas como setas (vermelho escuro) e as a hélices como rolos (azuis e amarelas). Os resíduos do sítio ativo Ser82, Asp229 e His251 estão indicados e a posição potencial do íon Ca^{2+} (figura reproduzida de JAEGER e REETZ, 1998).

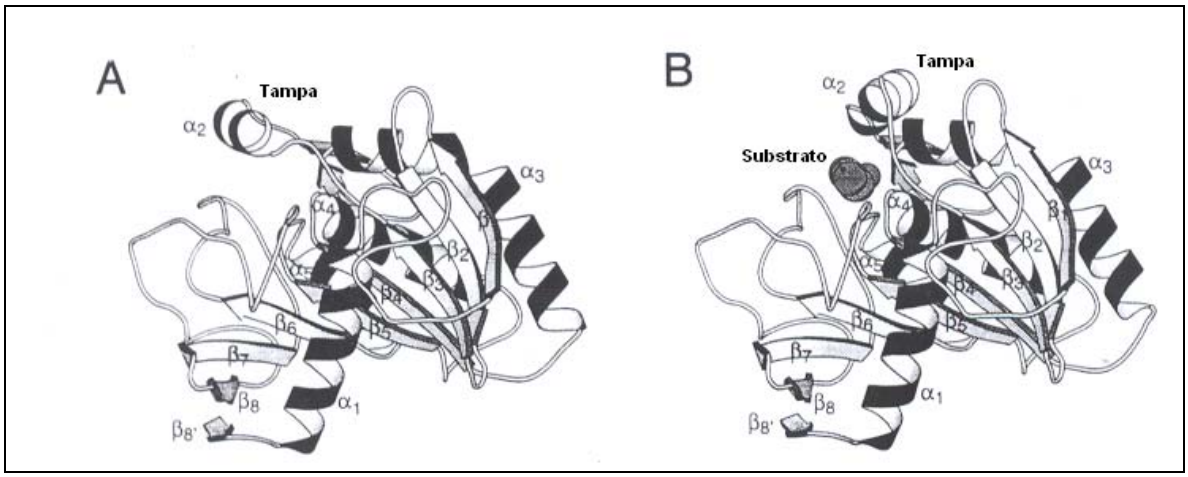

Figura 3.12. Esquema representativo das conformações "fechada" (A) e "aberta" (B) da lipase de *Rhizomucor miehei* (figura reproduzida de JÄÄSKELÄINEN et al. (1998).

Existem lipases que não apresentam essa "tampa", como por exemplo, a lipase de *Bacillus subtilis* reportada por POUDEROYEN *et al.* (2001). Os autores determinaram a estruturade raios-X dessa lipase, como representado na Figura 3.13. A tríade catalítica Ser77, Asp133 e His 156 estão em posições similares a outras lipases,

no entanto, não foi encontrada nenhuma tampa e o sítio ativo Ser77 está exposto a solventes.

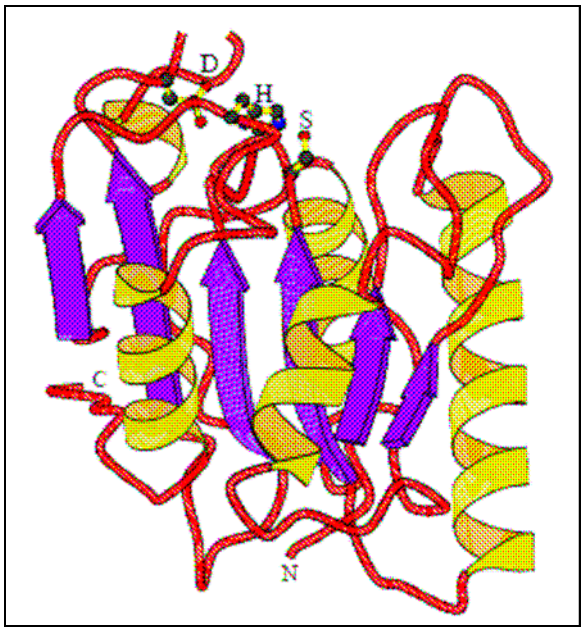

Figura 3.13. Representação da estrutura de lipase de *B. Subtilis*. Os resíduos da triade cataítica , Ser77, His156 e Asp133 são representados por S, H e D, respectivamente. As letras N e C indicam os N e C terminas. (Fonte: POUDEROYEN *et al.*, 2001).

O mecanismo de hidrólise de ésteres pelas lipases é apresentado na Figura 3.14. O resíduo de serina nucleofílico está localizado no C-terminal no final da lâmina β5 em um pentapeptídeo altamente conservado, formando uma volta β-α chamada de "cotovelo nucleofílico". A hidrólise do substrato começa com um ataque nucleofílico do oxigênio da serina do sítio catalítico no átomo de carbono da carboxila da ligação ester, levando a formação de um intermediário tetraédrico estabilizado por ligações hidrogênio à átomos de nitrogênio de resíduos da cadeia principal. Uma molécula de álcool é liberada, deixando um complexo acil-lipase, que é finalmente hidrolizado com a liberação do ácido graxo e a regeneração da enzima (JAEGER e REETZ, 1998).

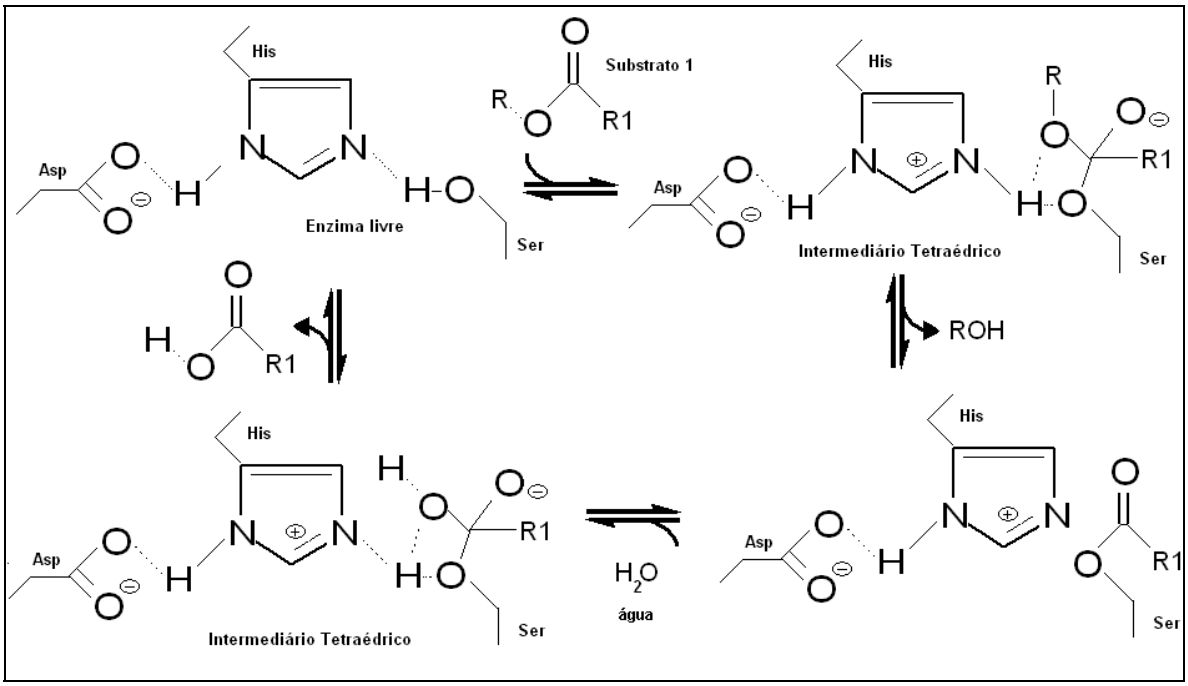

Figura 3.14. Mecanismo de reação de hidrólise de um éster por lipase (esquema reproduzido de HAEFFNER e NORIN, 1999).

3.4.1.3. Lipase Intracelular

Para uma enzima de origem microbiana produzida industrialmente, é melhor que esta se encontre no meio de cultura ou em extratos aquosos, pois a extração de enzimas intracelulares encarece o processo.

As lipases produzidas por microrganismos são, geralmente, extracelulares. No entanto, WATANABE *et al.* (1977) isolaram duas cepas de *P. nitroreducens* capazes de produzir lipases extracelulares e outras que permanecem ligadas à célula. Células de *Yarrowia lipolytica* também apresentam lipases extracelulares e duas ligadas à célula (OTA *et al.*, 1982). Estas moléculas requerem ativadores que podem, inclusive, ser produzidos pelo próprio microrganismo.

Segundo RATLEDGE e EVANS (1989 *apud* PEREIRA-MEIRELLES, 1997) em leveduras, as lipases ocorrem tanto internamente, para o *turn-over* dos lipídeos estocados quanto no meio extracelular para a quebra dos substratos lipídicos que serão utilizados como fonte de energia para o crescimento microbiano.

PEREIRA-MEIRELLES *et al.* (2000) estudaram a localização da lipase em células de *Y. lipolytica* e não detectaram lipase extracelular durante as primeiras 24 horas de cultivo, sugerindo que nesta fase a lipase intracelular (Frações L (ligada à

célula) e I (intracelular) – Figura 3.15) começa a ser liberada lentamente no meio de cultura e atinge seu máximo somente no final da fase estacionária de crescimento.

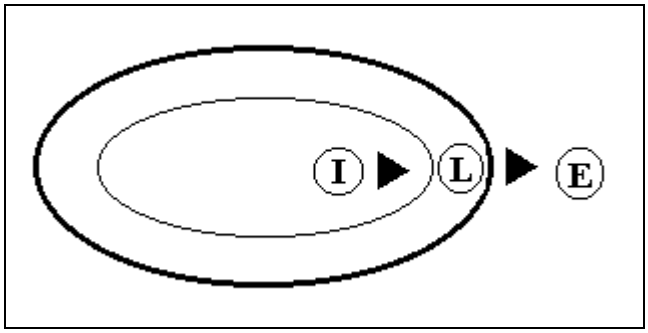

Figura 3.15. Representação esquemática da localização da lipase durante o cultivo de células de *Y. lipolytica*: (I) fração solúvel intracelular; Fração intracelular ligada à célula; (E) fração extracelular (figura reproduzida de PEREIRA-MEIRELLES *et al.*, 2000).

ADAMCZAK e BEDNARSKI (1996) detectaram atividade lipolítica intra e extracelular durante o crescimento de *Rhizomucor mieehei* e *Yarrowia lipolytica*. Considerando a economia da síntese de lipases, a utilização direta de lipases intracelulares com as próprias células, que são secas com acetona, tem sido estudada na esterificação (LEGIER e COMEAU, 1992), hidrólise de ésteres (DRUET *et al.*, 1992) e acidólise de óleos (LONG *et al.*, 1997). Atualmente, outra alternativa para a utilização de lipases intracelulares que se tem investigado é a imobilização passiva com partículas de suporte para biomassa (ADAMCZAK e BEDNARSKI, 2004).

3.4.1.4. Seletividade

Considerando-se que especificidade é a diferença na taxa de hidrólise entre dois substratos, pode-se classificar as lipases em dois grupos: lipases específicas e não específicas. As lipases não específicas são aquelas capazes de hidrolisar as ligações éster em qualquer posição do triacilglicerol, independente do tipo de ácido graxo presente (SZTAJER *et al.*, 1992). As lipases específicas conseguem diferenciar os ácidos graxos quanto a posição na molécula de glicerol e produzir ácidos graxos nas posições 1 e 3 do acilglicerol (regioespecificidade) (HEDRICH e SPENER, 1991) e ainda produzir ésteres e álcoois opticamente puros (estereoespecificidade) (LANG *et al.*, 1998).

A especificidade da lipase pelo substrato é bastante importante para a aplicação desta enzima. A lipase de *Y. lipolytica* 681 foi mais ativa em triacilgliceróis sintéticos

(tributirina e tricaprilina) do que em óleos naturais como os óleos de soja e milho, demonstrando uma maior especificidade por estes substratos. O óleo de oliva foi hidrolisado na mesma taxa que os triacilgliceróis sintéticos (CORZO e REVAH, 1999).

Segundo HADEBALL (1991), cepas de *Y. lipolytica* apresentam lipases que atuam preferencialmente em resíduos oléicos nas posições 1 e 3 do glicerídeo. No entanto, a caracterização *in vitro* da lipase extracelular não é suficiente para prever o padrão de lipólise em condições reais (GUERZONI *et al.*, 2001).

3.4.2. Condições de Produção das Lipases

O estudo do aumento da produtividade da lipase durante a fermentação é de grande importância, pois menores custos de produção podem propiciar novas aplicações industriais (CORZO e REVAH, 1999).

O crescimento microbiano e a formação de produtos ocorrem como resposta às diferentes condições ambientais (meio de cultura, temperatura, pH, etc.) e à expressão gênica. Cada microrganismo pode responder de forma diferente ao mesmo meio ambiente, assim como condições ambientais adversas podem causar alterações no comportamento (metabolismo, eficiência de produção, etc.) de uma mesma cepa microbiana.

Com o avanço da engenharia genética, muitas cepas foram manipuladas de modo a aumentar a produtividade de enzimas, barateando o custo de produção. DESTAIN *et al.* (1997) selecionaram um mutante de *Y. lipolytica* (mutagênese química) que produziu lipase extracelular com atividade 35 vezes maior que a cepa selvagem original. PIGNEDE *et al.* (2000) descreveram o gene *LIP2* responsável por toda a atividade lipolítica extracelular da cepa de *Y. lipolytica* W29. FICKERS *et al.* (2005) amplificaram o gene *LIP2* de um mutante de *Y. lipolytica* superprodutor de lipase, chamado LgX64.81, e obtiveram 26.450 U/mL de lipase em operação batelada e 158.246 U/mL em batelada alimentada.

Os itens a seguir descrevem alguns parâmetros que influenciam a produção de lipases microbianas.

3.4.2.1. Meio de Cultura

A composição do meio de cultura (fonte de carbono, nitrogênio, presença de indutores, etc.) tem sido extensivamente estudada, com o intuito de se obter melhores rendimentos do produto de interesse, ou seja, a produção e excreção da lipase. Muitas vezes a substituição de uma fonte de carbono, por exemplo, pode causar efeitos surpreendentes, melhorando ou até mesmo prejudicando o objetivo final. Além disso, deve-se considerar o custo das matérias-primas utilizadas, pois em alguns casos, estes podem inviabilizar a produção.

A Fonte de Carbono

Como fonte de carbono, na produção de lipases, tem sido reportada a utilização de carboidratos, óleos ou gorduras, triacilgliceróis puros, ácidos graxos, glicerol e até mesmo surfactantes, como o *Tween* 80 (LI *et al*., 2001 e 2004). Em alguns casos, observa-se a utilização concomitante de açúcar e do óleo ou do açúcar e do ácido graxo, sendo o lipídeo utilizado normalmente como indutor.

DALMAU *et al*. (1999) apresentaram resultados que mostram o efeito repressor da glicose na produção de lipase de *Candida rugosa*. Com esta mesma levedura, a produção de lipase constitutiva foi induzida na presença de glicose como fonte de carbono (LOTTI *et al*., 1998 *apud* SHARMA *et al*., 2001). Além disso, há alguns trabalhos que demonstram o efeito indutor deste mesmo açúcar na produtividade da lipase de diferentes cepas de *Yarrowia lipolytica* (CORZO e REVAH, 1999) e de outros microrganismos, como o fungo *Antrodia cinnamomea* (LIN e KO, 2005).

PEREIRA-MEIRELLES *et al*. (1997) reportaram que nenhuma atividade lipolítica foi detectada no meio de cultura contendo sacarose como fonte de carbono para *Yarrowia lipolytica* 583. Esse resultado foi justificado pela detecção de uma atividade invertásica extremamente baixa para esta cepa e, conseqüente, ausência de consumo de sacarose. Neste mesmo trabalho, o consumo de sacarose e a atividade invertásica para outras cepas de *Y. lipolytica* foram acompanhados durante o cultivo e o comportamento observado foi o mesmo.

Os óleos vegetais (oliva, soja, girassol, gergelim, semente de algodão, milho e amendoim), quando usados como fonte de carbono, resultam, geralmente, em altos níveis de atividade lipásica (SHARMA *et al*., 2001; TAN *et al*. 2003; BURKERT *et al*., 2004). Esses óleos são considerados substratos economicamente viáveis para a produção de lipase em escala industrial. O trabalho de CORZO e REVAH (1999) demonstrou que os óleos de oliva e de milho foram os melhores para o caso da

produção de lipase de uma cepa de *Yarrowia lipolytica*. De fato, o óleo de oliva é freqüentemente utilizado na composição de meios de cultura para produção de lipases. Os óleos animais, ao contrário dos vegetais, quase sempre inibem a produção de lipases (TAN *et al.*, 2003).

PEREIRA-MEIRELLES (1997) comparou a utilização de glicose e óleo de oliva no meio de cultivo de *Y. lipolytica*, obtendo o dobro da atividade lipolítica com a adição do óleo. Além disso, manteve altos valores de atividade por um maior período de tempo, o que foi atribuído pelo autor a níveis inferiores de proteases encontrados no meio contendo óleo de oliva. A utilização concomitante dos dois substratos também foi testada e o pico de atividade foi deslocado para tempos superiores (400 h), em relação ao meio com óleo puro (150 h), sugerindo o consumo preferencial de glicose nessas condições. A máxima atividade lipolítica no cultivo de *Y. lipolytica* foi obtida quando a concentração inicial de óleo foi igual a 1% (p/v), que foi a mesma concentração ótima encontrada por ELLAIAH *et al*. (2004) na produção de lipase por células de *Aspergillus niger* livres ou imobilizadas. Para *S. cerevisiae* 1525 *e Williopsis californica* 1639 isolados de óleo de oliva extravirgem, a produção de lipase foi maior quando a água foi adicionada ao óleo de oliva (fonte de carbono) na razão de 0,25% (v/v) e 1% (v/v) respectivamente para cada microrganismo (CIAFARDINI *et al.*, 2006).

Sendo o glicerol um dos produtos finais da reação de hidrólise do triacilglicerol é de se esperar que este composto possa reprimir a produção de lipase. Os resultados obtidos por CORZO e REVAH (1999) e PEREIRA-MEIRELLES (1997) confirmam tal fato já que, trabalhando com *Y. lipolytica*, os pesquisadores não detectaram atividade lipolítica significativa no meio de cultura contendo glicerol como fonte de carbono. No entanto, o ácido oléico pode ser usado como fonte de carbono para alguns microrganismos com bons resultados como para *Y. lipolytica* (PEREIRA-MEIRELLES, 1997; FICKERS *et al.*, 2004) e *C. rugosa* (WEI *et al.*, 2004). WEI *et al.* (2004) utilizaram também um cosolvente, o dodecano, o que aumentou a solubilidade dos substratos sólidos e do oxigênio, resultando em uma melhora na produção de lipase realizada em reator batelada.

A Fonte de Nitrogênio

Segundo a literatura, as fontes de nitrogênio mais utilizadas na produção de lipases são: peptona, uréia, sulfato de amônio, extrato de lêvedo, cloreto de amônio e nitrato de amônio. Geralmente, os microrganismos fornecem altos rendimentos de lipase quando se utiliza como fonte de nitrogênio um composto orgânico (SHARMA *et al.*, 2001).

NOVOTNY *et al*. (1988) mostraram que a uréia foi a melhor fonte de nitrogênio para aumentar a atividade lipolítica em seis leveduras diferentes, entre elas *Y. lipolytica* e *C. deformans*. CORZO e REVAH (1999) também obtiveram este resultado para *Y. lipolytica* 681, o que sugere que a uréia é excelente fonte de nitrogênio para esta levedura. Quando os autores utilizaram peptona como fonte de nitrogênio, resultados positivos para a produtividade da lipase só foram obtidos com a utilização concomitante deste composto com uréia e, mesmo assim, melhores resultados foram alcançados utilizando-se apenas uréia. No entanto, esses resultados contrastam com o reportado por PEREIRA-MEIRELLES *et al.* (1997) que encontram valores muito inferiores de atividade lipolítica quando empregaram uréia no meio de cultivo (150 $U.L^{-1}$) em comparação com a utilização de peptona (2700 $U.L^{-1}$). Certamente o efeito desses compostos depende da cepa utilizada.

Muitos trabalhos reportam o efeito repressor do sulfato de amônio sobre o crescimento de algumas cepas de *Y. lipolytica* e baixa atividade lipolítica são encontradas quando este composto é utilizado como fonte de nitrogênio (PEREIRA-MEIRELLES *et al.*, 1997; CORZO e REVAH, 1999 e NOVOTNY *et al.*, 1988). Entretanto, esta foi a melhor fonte de nitrogênio inorgânico para a produção de lipase de *Candida* sp. (TAN *et al.*, 2003). Para uma cepa de *Y. lipolytica* mutante superprodutor de lipase, triptona N1 foi a melhor fonte de nitrogênio para produção dessa enzima (FICKERS *et al*., 2004).

O extrato de lêvedo apresenta resultados razoáveis para a produção de lipases e induz o crescimento de biomassa, já que não é apenas uma fonte de nitrogênio, mas também de vitaminas (ALONSO, 2001; LI *et al.*, 2004).

Presença de Indutores

A literatura reporta a utilização de muitos indutores para estimular a produção de lipases microbianas, como: óleo de oliva, trioleína, outros óleos vegetais, colesterol e sais biliares, ácidos graxos, surfactantes como *Tween*, *Span*, *Triton* ou ativadores produzidos pelo próprio microrganismo.

Triglicerídeos, ácido oléico e detergentes não iônicos (*Span*, *Tween*) foram capazes de estimular o aparecimento de lipase solúvel de *Y. lipolytica*, crescida em um meio complexo contendo citrato e uréia (NOVOTNY e DOLEZALOVA, 1993).

Trabalhando com esta mesma levedura, CORZO e REVAH (1999) mostraram que os óleos de oliva e de milho foram os melhores indutores para a produção de lipase. OTA *et al.* (1968) já haviam demonstrado que os óleos naturais ricos em ácidos graxos

insaturados são melhores indutores do que os saturados para produção de lipases de células de *Y. lipolytica*, como é o caso dos óleos de milho e de oliva.

O ácido oléico, apesar de ser um produto da reação de hidrólise do triacilglicerol, principalmente do óleo de oliva (71% de ácido oléico), tem sido reportado como uma boa fonte de carbono (PEREIRA-MEIRELLES *et al*., 1997) na produção de lipases de *Y. lipolytica*. No entanto, ele também é citado como inibidor da atividade da lipase (CORZO e REVAH, 1999; CASTELLAR *et al*., 1996).

Como foi mencionado no item 3.4.1.3, *Yarrowia lipolytica* apresenta lipase ligada à célula. O efeito do *Tween* foi estudado nas células de *Yarrowia lipolytica* 681 e os resultados sugerem que este surfactante pode estar atuando na permeabilidade da célula e, portanto, aumentando a excreção da lipase ou pode ter um efeito surfactante nas lipases ligadas à célula (CORZO e REVAH, 1999). Neste trabalho, foi observado que a máxima atividade lipolítica foi obtida em concentrações de *Tween* entre 0,5 e 2 $g.L^{-1}$, como mostra a Figura 3.16.

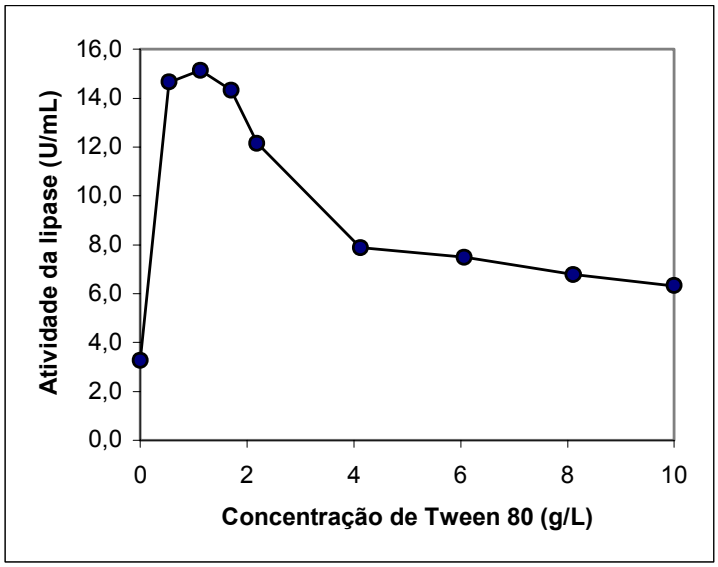

Figura 3.16. Efeito da concentração de *Tween 80* na produção de lipase de *Y. lipolytica* 681 (Resultado reproduzido de CORZO e REVAH, 1999).

Alguns polissacarídeos também podem ser usados para aumentar a produção da lipase extracelular, como foi reportado por WINKLER e STUCKMANN (1979) que estudaram a formação de lipase em cultivos da bactéria *Serratia marcescens*. Hialuronato, pectina, glicogênio e goma arábica foram, dos 21 polissacarídeos testados, os que forneceram resultados positivos. PEREIRA-MEIRELLES (1997) utilizou glicogênio, goma arábica, ácido poligalacturônico e pectina no meio de cultivo de *Y. lipolytica* e em ensaios *in vitro* com a lipase e os resultados mostraram que todos os

polissacarídeos foram capazes de aumentar e antecipar os máximos de atividade obtidos durante o cultivo, mas apenas o glicogênio aumentou significativamente a atividade da lipase nos experimentos *in vitro*. Devido à estrutura ramificada do glicogênio, é possível que esse polissacarídeo interaja diretamente com a porção glicosilada das glicoproteínas exercendo efeito protetor contra, por exemplo, a ação de proteases no meio ou ainda, promovendo uma mudança conformacional na enzima, o que pode torná-la mais ativa. Uma outra explicação para os resultados reportados, que não exclui as anteriores, seria uma interação de polissacarídeos com sítios específicos da superfície celular, competindo pelo sítio de ligação da enzima com a parede causando a sua liberação para o meio extracelular. De fato, ARVINDEKAR e PATIL (2002) reportaram que o glicogênio em *S. cerevisiae* está presente de duas formas: uma solúvel e intracelular e outra pouco solúvel devido à ligação covalentemente com a glucana da parede celular. Além disso, como já foi mencionado anteriormente (item 3.4), KAWASSE (2001) verificou que em condições de estresse oxidativo, os níveis de glicogênio intracelular diminuem, simultaneamente com a redução da atividade lipolítica intracelular e aumento da atividade extracelular.

3.4.2.2. Condições de Operação

A Influência da Temperatura

Tanto o crescimento microbiano quanto às reações enzimáticas em si são fenômenos dependentes da temperatura. Em geral, o crescimento de um microrganismo mesofílico se dá na faixa de 25 a 30º C e a produção de lipases ocorre na faixa de 27 a 30ºC (PEREIRA-MEIRELLES, 1997).

CORZO e REVAH (1999) detectaram que a temperatura foi o fator que mais influenciou a produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* 681 entre os demais fatores estudados (pH e tempo de incubação). Através de uma análise estatística, encontraram a temperatura de 29,5ºC como sendo a melhor temperatura para a produção de lipase desta cepa.

A Influência do pH

A produção de lipases também é bastante sensível a mudanças no pH. Na maioria dos casos, o pH adequado à produção de lipases por células de leveduras deve ser mantido próximo à neutralidade ou ligeiramente ácido (5,5 a 7,0) (PEREIRA-MEIRELLES, 1997).

Parece haver relação direta entre a temperatura e o pH ótimos para o crescimento microbiano e a formação de produtos. CORZO e REVAH (1999) obtiveram resultados que evidenciam este fato, pois a análise estatística mostrou que a interação entre os fatores pH e temperatura foram mais importantes na produção de lipases do que o fator pH por si só. Desta mesma análise os autores obtiveram o pH ótimo de produção de lipase para a *Yarrowia lipolytica* 681 igual a 4,7.

O Tipo do Processo de Produção

A literatura reporta dois tipos de sistemas de produção de lipases: fermentação em meio sólido e fermentação submersa.

A fermentação em estado sólido é bastante interessante do ponto de vista econômico, pois tem a possibilidade de aproveitar agro-resíduos, principalmente em países com abundância de biomassa. No entanto, apresenta dificuldades como o difícil controle e monitoração do processo e a baixa oxigenação. É um tipo de fermentação geralmente mais utilizado para fungos filamentosos, com algumas exceções. KAMINI *et al*. (1998) estudaram a produção de lipase por *Aspergillus niger* utilizando torta de óleo de gergelim. Resíduos da extração de óleo de oliva e bagaço de cana-de-açúcar foram utilizados por CORDOVA *et al*. (1998) no cultivo de *Rhizomucor pusillus* e *Rhizopus rhizopodiformis* e obtiveram melhor atividade lipolítica com o bagaço de cana-de-açúcar e com a mistura dos dois sólidos. *Penicillium restrictum* foi utilizado para produção de lipase em resíduo sólido da indústria de óleo de babaçu, obtendo atividade máxima em 24 h de cultivo quando o resíduo foi suplementado com 2% de óleo de oliva (GOMBERT *et al*., 1999).

A fermentação submersa é a mais utilizada para produção de lipase e é realizada em frascos agitados (PEREIRA-MEIRELLES, 1997; CORZO e REVAH, 1999), em fermentadores de bancada (GULATI *et al*., 2000; ALONSO *et al*., 2005) ou em fermentadores em escala industrial (FICKERS *et al*., 2006). De uma forma geral, a fermentação submersa é conduzida de forma descontínua, mas a produtividade pode ser aumentada, em alguns casos, pela condução por batelada alimentada (LI *et al*., 2004; LI *et al*., 2005; KIM e HOU, 2006) ou de forma contínua (GILBERT *et al*., 1991; GORDILLO *et al*., 1998).

A Influência da Aeração e da Agitação

Condições aeróbias são essenciais para a produção de lipases, principalmente se o microrganismo produtor for estritamente aeróbio, como a levedura *Y. lipolytica*, pois

nesse caso, o oxigênio é preferencialmente utilizado como aceptor final de elétrons, reoxidando moléculas na cadeia respiratória.

A produção de diversas substâncias em escala laboratorial é realizada tradicionalmente em erlenmeyers incubados em banhos agitados. Portanto, nesses casos, para se estudar a influência da concentração de oxigênio na produção de lipases é comum variar o volume de meio de cultura em frascos com volume constante. Desta forma, quanto maior o volume de meio, menor é a disponibilidade de oxigênio, pois se reduz à superfície de contato com o ar.

CORZO e REVAH (1999) realizaram experimentos em erlenmeyers de 250 mL com volumes de meio de cultura de 30, 50 e 100 mL. A produção de lipases foi melhor em maiores volumes de meio de cultura. PEREIRA-MEIRELLES (1997) demonstrou que a razão Volume de meio/Volume do frasco (Vmeio/Vfrasco) altera sensivelmente o nível de atividade, o que mostra haver uma concentração de oxigênio dissolvido crítica, abaixo/acima da qual os níveis de atividade enzimática são muito inferiores.

Muitos outros trabalhos têm demonstrado que a agitação e a aeração são parâmetros que influenciam diretamente a produção de lipases (CHEN *et al.*, 1999; ELIBOL e OZER, 2000; TAN *et al.*, 2003). CHEN *et al.* (1999) verificaram que o aumento da velocidade de agitação, no cultivo de *Acinetobacter radioresistens*, levou à obtenção de maiores valores de atividade lipásica como também a diminuição do tempo de obtenção do valor máximo de atividade. Nesse mesmo trabalho, o aumento da concentração de oxigênio dissolvido aumentou significativamente os valores de atividade, mas concentrações superiores a 20% não alteraram a produção. Resultados semelhantes foram obtidos por ELIBOL e OZER (2000) na produção de lipase de *Rhizopus arrhizus* e por TAN *et al.* (2003) na produção de lipase de *Candida sp*.

O aumento da agitação de 250 para 300 rpm levou a um aumento na produção de lipases de *Aspergillus terreus* em fermentador de 10 litros; entretanto, maiores velocidades de agitação acarretaram em menores valores de atividade lipásica. O aumento da aeração, nesse estudo, não influenciou a produção de lipases (GULATI *et al.*, 2000). Resultados semelhantes para o efeito do aumento da agitação foram obtidos por ALONSO *et al.* (2005) na produção de lipases de *Y. lipolytica* em um fermentador de 2 L utilizando óleo de oliva como fonte de carbono. Os autores detectaram um aumento de quase 5 vezes na atividade máxima com o aumento da velocidade de agitação de 100 para 200 rpm. O aumento na velocidade de agitação resultou em menor rendimento e produtividade, o que foi atribuído pelos autores aos danos celulares causados por estresse mecânico, que foi constatado pela perda de viabilidade celular nessas condições. ALONSO *et al.* (2005) também estudaram o efeito do aumento da

vazão de oxigênio na produção da lipase e observaram o aumento da produtividade volumétrica dessa enzima com o aumento da vazão de ar.

Otimizando a produção de lipase por *C. rugosa*, PUTHLI *et al.* (2005) utilizaram um reator de 2 L com 3 impelidores, e obtiveram maior produtividade com velocidade de agitação de 600 rpm e 50,34 cm^3 s^{-1} de fluxo de ar e aumentaram a produção de lipase em 2,5 vezes com um rearranjo das posições dos impelidores. ELIBOL e OZER (2000) reportaram que a produtividade da lipase de *Rhizopus arrhizus* é fortemente dependente da taxa de transferência de oxigênio, como pode ser observado na Figura 3.17, que apresenta a produtividade da lipase *versus* o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La).

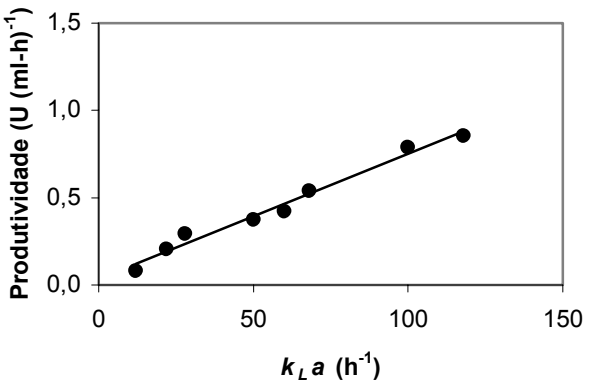

Figura 3.17. Correlação entre a produtividade da lipase e o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio k_La (Resultado reproduzido de ELIBOL e OZER, 2000).

Os resultados presentes na literatura indicam que a produção de lipases microbianas não é apenas dependente do conteúdo de oxigênio presente no meio, dado que muitas vezes o aumento da vazão de ar não confere maiores valores de atividade lipolítica, mas sim da quantidade de oxigênio disponível para o microrganismo. A maioria dos dados reportados demonstra um aumento de produtividade da lipase com o aumento da agitação do sistema, que promove uma melhora na transferência de oxigênio e, portanto, aumenta disponibilidade deste substrato ao microrganismo. No entanto, este artifício apresenta limitações dado que a partir de uma determinada velocidade de agitação os microrganismos começam a sofrer danos por cisalhamento.

Uma forma de aumentar a transferência de oxigênio na produção de lipases, sem causar danos aos microrganismos e que vem sendo cogitada é a adição dos carreadores de oxigênio, substâncias que comprovadamente aumentam o k_La do sistema. ELIBOL e OZER (2000) observaram o aumento da produção de lipases com a adição de 10% de

PFC. AMARAL (2003) obteve um aumento na produtividade da lipase de *Y. lipolytica* de 24 vezes com a inclusão de 20% de PFC no meio de cultivo. Ainda são necessárias investigações no sentido de elucidar os mecanismos de transferência de massa presentes em tais sistemas para possibilitar a otimização das condições de operação, como a vazão de aeração, velocidade de agitação, concentração do carreador, etc.

4. METODOLOGIAS EXPERIMENTAIS

4.1. Materiais

Os componentes dos meios de cultivo utilizados foram: Peptona e Extrato de lêvedo (*Oxoid* - Hampshire, UK), Glicose (*Reagen* – R.J., Brasil) e Agar (*Vetec* – R.J., Brasil).

O Perfluorocarboneto escolhido foi a perfluorodecalina ($C_{10}F_{18}$), comercialmente chamado de Flutec PP6 obtido pela *F2 Chemicals Ltd* (Preston, Lancashire, UK). As propriedades físicas relevantes a 25 ºC e 1 atm são: densidade, 1,917 $g.mL^{-1}$; ponto de ebulição, 142 °C e solubilidade do oxigênio, 127,8 $mg.L^{-1}$ (DIAS *et al*., 2004).

Lipase de *Candida lipolytica*, *p*-nitrofenil laurato, Goma arábica e *Span 20* foram obtidos por *Fluka* (Seelze, Germany).

Pronase (Protease de *Streptomyces griseus*), Azocaseína, Goma xantana, *Tween 80*, *Pluronic F-68*, Fenil sefarose CL 4B, *n*-hexadecano, tolueno, hexano, clorofórmio e éter etílico foram obtidos por *Sigma-Aldrich CO* (MO, USA).

Foram utilizadas Membrana em éster de celulose 0,45 μm (*Millipore*, S.P., Brasil) e Membrana de diálise (*Medicell International Ltd*., London, UK).

O óleo de oliva (azeite extravirgem) utilizado foi da marca "Andorinha" (Elaborado por *Simão e Ca, Comércio e Indústria S.A*., Alferrarede, Portugal) com 0,5% de acidez mácima.

Nitrogênio industrial foi obtido de *White Martins Praxair Inc* (R.J., Brazil).

4.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados nos experimentos e nas análises foram:

1) Centrífuga *Fanem* modelo *204-NR*;
2) Centrífuga *Sigma 2K 15*;
3) Espectrofotômetro *Hach DR/4000 UV*;
4) Espectrofotômetro *Jenway 6300 Spectrophotometer*

5) Capela de fluxo laminar equipada com luz UV – *Labconco*;
6) Incubador com agitação (*shaker*) *Certomat BS-1*;
7) Microscópio ótico *Olympus*, modelo BX51;
8) Câmera Digital *Olympus*;
9) Biorreator de Bancada (*Multigen, New Brunswick Scientific Co.*, EUA);
10) Medidor de ângulo de contato *Oca 15 Plus*, *Dataphysics*;
11) Tensiômetro NIMA DST 9005 (*NIMA Technology*, Ltd);
12) Sonicador *Vibra Cell*™ (*Sonics*);

4.3. Microrganismos

A principal levedura empregada no presente trabalho foi uma cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* 583 (IMUFRJ 50682) selecionada de um estuário da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, Brasil (HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1981) e identificada pelo Instituto de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

As cepas *Yarrowia lipolytica* W29 (ATCC20460; CLIB89) e *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 32167) foram cedidas gentilmente pelo Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho (Braga, Portugal). Essas cepas foram usadas para comparação dos resultados de caracterização da superfície celular e, no caso de *Y. lipolytica*, para comparação com os resultados de produção de lipase na presença de PFC.

4.4. Preservação

As células foram conservadas a 4ºC após 24 horas de crescimento em tubos de ensaio com meio YPD ("***Y**east Extract*, ***P**eptone*, ***D**extrose*") contendo (em p/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2%, glicose 2% e Agar-agar 2%.

4.5. Cultivos

A partir dos tubos contendo as células preservadas em meio sólido YPD (descrito no item 4.4) inoculava-se, de forma estéril com uma alça de platina, 200 mL de meio de cultivo YPD em erlenmeyers de 500 mL. Após cerca de 70 horas em um incubador rotatório a 29ºC, 160 rpm, a absorvância (570 nm) de uma amostra deste cultivo era determinada e, em seguida as células eram centrifugadas de forma estéril a 3.000 *g* por 10 minutos e ressuspensas em 10 mL de meio de cultivo servindo de inoculo dos experimentos que serão descritos nos itens posteriores. O volume centrifugado desse pré-inóculo era suficiente para se obter uma concentração inicial de células de, aproximadamente, 1,0 ± 0,1 mg p.s. cel/mL nos meios de cultivo.

4.5.1. Experimentos Preliminares

Os experimentos preliminares com PFC foram realizados em Erlenmeyer de 500 e 1000 mL com 200 mL de meio líquido (composição na Tabela 4.1), a 29ºC em incubador rotatório (*shaker*) em duas velocidades de agitação diferentes: 160 e 250 rpm. Tais velocidades de agitação foram utilizadas a fim de se verificar a influência da dispersão do oxigênio nas variáveis de cultivo estudadas (crescimento celular, consumo de substrato e produção de lipase extracelular). Esses experimentos foram realizados por 50 horas com amostragem diária de crescimento celular, glicose e atividade da lipase.

Tabela 4.1. Composição do meio de cultivo dos experimentos com perfluorocarboneto.

Líquido	Controle (0% PFC)	10% PFC	20% PFC
Perfluorocarboneto (mL)	-	20	40
Meio YPD* (mL)	200	180	160

O meio YPD* é o meio YPD (1% de extrato de lêvedo, 1% de peptona, 2% de glicose, p/v) modificado, ou seja, com concentração de 0,64% (p/v) de peptona. Nesse meio é utilizada a concentração mínima de peptona necessária para o crescimento celular devido ao alto custo desse composto.

4.5.2. Experimentos em Biorreator

Foi utilizado um biorreator de bancada (*Multigen, New Brunswick Scientific Co.,* EUA) com capacidade de 2 L. O equipamento contendo sistema de aeração, agitação magnética e controle de temperatura era provido de duas turbinas e duas chicanas, como mostra a Figura 4.1. Três diferentes tipos de impelidores foram utilizados em pares nos experimentos: tipo *A* – turbina tipo *Rushton* com pás retas verticais; tipo *B* - turbina tipo *Pitched* com pás inclinadas (Fluxo axial) e *C* – turbina tipo *Marine propeller* em hélice, que são apresentados na Figura 4.2. Uma sonda polarográfica de oxigênio (Lutron DO-5510, *Lutron Electronics Co., Inc*) foi utilizada para medição da concentração de oxigênio dissolvido no interior do biorreator. As características do biorreator, do eletrodo de oxigênio e dos impelidores utilizados são apresentadas na Tabela 4.2. O suprimento de oxigênio foi realizado com ar atmosférico com auxílio de um sistema de aeração submerso através de 12 orifícios na haste de agitação com 7 mm de diâmetro localizados a 1,82 cm de distância do fundo do biorreator. Antes de entrar no biorreator, o ar atravessava um filtro de ar (*Advantec, Toyo Roshi Kaisha,* Japão) com porosidade de 0,2 μm.

Figura 4.1. Foto do Biorreator de bancada (Multigen, New Brunswick Scientific Co., EUA) com capacidade de 2 L.

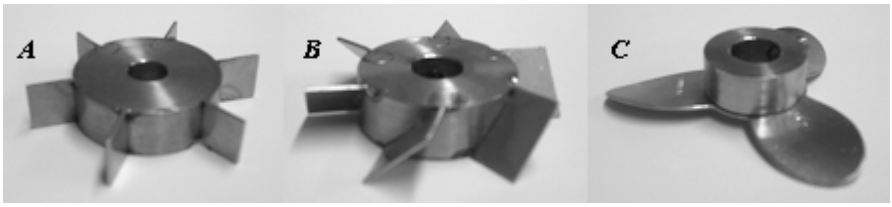

Figura 4.2. Tipos de impelidores utilizados (*A* – turbina tipo *Rushton* com pás retas verticais; *B* - turbina tipo *Pitched* com pás inclinadas (Fluxo axial) e *C* – turbina tipo *Marine propeller* em hélice).

Tabela 4.2. Características do biorreator e dos impelidores utilizados

Parâmetro	Impelidor		
	Tipo *A*	Tipo *B*	Tipo *C*
***d* (mm)**	47	48	47
d*/*D	0,42	0,43	0,42
H*/*D	4,89	4,89	4,89
w*/*d	0,19	0,41	-
l*/*d	0,28	0,21	0,32
h_1/d	0,74	0,72	0,74
h_2/d	0,64	0,63	0,64
Número de pás	6	6	3
Número de chicanas	2	2	2
s*/*d	0,30	0,29	0,30
d'*/*d	0,15	0,15	0,15
l'*/*d	1,23	1,20	1,23

d diâmetro do impelidor (mm)
d' diâmetro do eletrodo de oxigênio (mm)
D diâmetro do biorreator (mm)
h_1 distância do impelidor superior ao inferior (mm)
h_2 distância do impelidor inferior ao fundo do biorreator (mm)
H altura do biorreator (mm)
l comprimento das pás da turbina (mm)
l' comprimento de imersão do eletrodo de oxigênio (mm)
s comprimento da chicana (mm)
w altura da lamina do impelidor (mm)

Para se estudar a capacidade de transferência de oxigênio do equipamento utilizado foram realizadas medidas de k_La a 29 ºC e com 1,0 ou 1,5 L de volume de trabalho. Foram testadas diferentes vazões de ar (Q), variando de 0,5 a 2,0 $L.min^{-1}$, diferentes velocidades de agitação, variando de 150 a 350 rpm e três tipos de impelidores, como mostra a Figura 4.2. Tais medidas foram realizadas em água, em meio de cultivo YPD*, esterilizado em autoclave, na presença e ausência de células inativas.

Os experimentos de produção de lipase no biorreator foram realizados nas melhores condições de transferência de oxigênio determinadas no estudo da capacidade

de transferência de oxigênio do equipamento. Foi utilizado meio de cultivo YPD*, com acompanhamento de crescimento celular, atividade lipolítica e glicose por cerca de 120 horas.

4.5.3. Esterilização

Todos os componentes do meio de cultivo foram esterilizados em autoclave a 0,5 atm por 15 minutos. O perfluorocarboneto foi esterilizado separadamente, nas mesmas condições, para poder saturá-lo com ar antes de adicioná-lo com o meio de cultivo. O PFC era saturado com ar através da aeração forçada por 15 minutos após esterilização.

O biorreator, as pipetas, os tubos de centrífuga e outros instrumentos utilizados no manuseio do meio de cultivo foram esterilizados em autoclave a 1 atm por 25 minutos.

O eletrodo de oxigênio foi desinfetado à parte, mergulhando-o em uma solução de álcool etílico 70% (v/v) por 30 minutos.

4.5.4. Recuperação do PFC

Para recuperação do PFC, o meio de cultivo contendo PFC era colocado em um funil de separação, após o término do experimento, deixando em repouso por, aproximadamente, 15 minutos para a separação das fases. Cerca de 60% do PFC sai límpido do funil de separação após abertura da torneira. O restante é centrifugado a 2000 g por 5 minutos e vertido em um funil com membrana *Millipore* (0,45 μm). Uma massa de células contendo PFC fica retida no papel de filtro e, portanto, é necessário colocar a 100 ºC por cerca de 15 minutos para as células serem liberadas do PFC e, depois, esse ser filtrado. Para os experimentos realizados em erlenmeyer era possível recuperar em torno de 80 a 90 % do PFC, enquanto que quando o PFC era usado no biorreator, esse percentual de recuperação reduziu para 60 a 70%.

4.6. Determinação da Capacidade de Transferência de Oxigênio

A determinação da capacidade de transferência de oxigênio através da medição do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, k_La, é fundamental para a caracterização de biorreatores em processos aeróbios. Através desse parâmetro é possível estabelecer as condições ótimas de agitação e aeração e quantificar os efeitos de cada um dos fatores que influenciam a transferência de oxigênio.

A determinação da capacidade de transferência de oxigênio foi realizada sem células ou com células inativadas pelo método da desgaseificação, e com células, durante os experimentos para produção de lipase, através do método dinâmico.

Como os valores de k_La obtidos foram em todos os casos inferiores a 0,03 s^{-1}, assumiu-se que a resposta do eletrodo de oxigênio às variações na concentração de oxigênio dissolvido foi rápida o suficiente e não afetou a acurácia das determinações.

. Since the k_La values were in all cases inferior to 0.3 s^{-1}, it was assumed that the response of the oxygen electrode to the variations in oxygen concentration is fast enough and does not affect the accuracy of the determination

4.6.1. Método da Desgaseificação

O ensaio consiste em inicialmente borbulhar nitrogênio gasoso no líquido, a fim de eliminar todo o oxigênio dissolvido, até que o eletrodo de oxigênio indique o valor zero (SCHMIDELL, 2001). A seguir, em um dado instante, inicia-se a aeração e a agitação do meio líquido, nas condições em que se pretende obter o valor de k_La, passando-se então a registrar o sinal da sonda. Esse sinal sairá do valor zero, aumentando até atingir a saturação, ou seja, até que o eletrodo indique o valor da concentração de saturação de oxigênio dissolvido, como mostra a Figura 4.3.

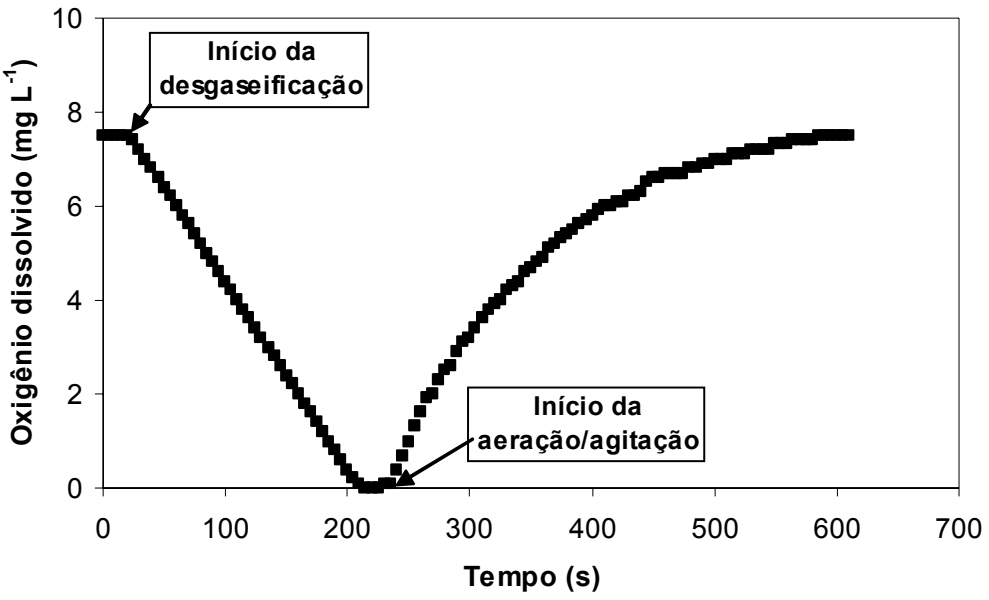

Figura 4.3. Monitoração da concentração de oxigênio dissolvido no meio durante a realização do método da desgaseificação com nitrogênio (BAILEY E OLLIS, 1986).

Nessas condições, a Eq. (3.9) pode ser integrada:

$$\int_0^{C_L} \frac{dC_L}{\left(C_L^* - C_L\right)} = \int_0^t k_L a \, dt \tag{4.1}$$

Resultando em:

$$Ln\left(\frac{\left(C_L^* - C_L\right)}{\left(C_L^*\right)}\right) = k_L a * t \tag{4.2}$$

Ao se colocar em um gráfico o logaritmo de ($1-C_L/C_L^*$) em função do tempo, a partir dos dados experimentais obtidos pelo ensaio, deve-se obter uma reta cujo coeficiente angular fornece o valor de $k_L a$, como mostra a Figura 4.4.

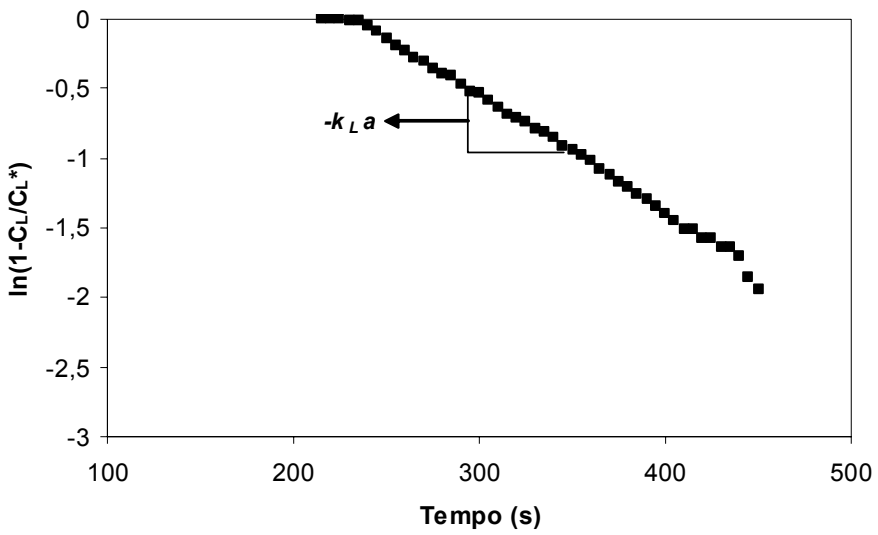

Figura 4.4. Representação logarítmica de (1-C_L/C_L*) ao longo do tempo.

Esta metodologia foi empregada para determinação do coeficiente de transferência de oxigênio em frascos agitados e no biorreator de bancada utilizando água, meio YPD* ou meio YPD* com perfluorodecalina e ainda com meio YPD* na presença de células de *Y. lipolytica* inativas.

Para medidas de k_La com células inativas, células de *Y. lipolytica* previamente cultivadas em frascos contendo meio YPD* sob agitação de 160 rpm por 96 horas, eram inativadas pela adição de 30 % (v/v) de etanol. Após agitação de 160 rpm por 10 minutos, as células eram centrifugadas e adicionadas em meio YPD* na concentração determinada. Medidas de viabilidade celular, pelo método de unidades formadoras de colônias, no início e ao final das medidas de k_La eram realizadas. Não se detectou vialbilidade celular em nenhum dos dois casos.

4.6.2. Método Dinâmico

Na presença de células ativas e na ausência de aeração, HUMPHREY e TAGUCHI (1966) utilizaram a atividade respiratória dos microrganismos para removerem o oxigênio do meio. Este método tem a vantagem de ser realizado durante a fermentação fornecendo um resultado mais real para o k_La.

O equacionamento do balanço de oxigênio de um biorreator contendo células no meio líquido é dado por (SCHMIDELL, 2001):

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a\left(C_L^* - C_L\right) - q_{O2}.X \tag{4.3}$$

onde, q_{O2} é a taxa específica de respiração celular (gO_2 (g de célula)$^{-1}$ h^{-1}) e X é a concentração celular (g de célula m^{-3}). A Eq. (4.3) indica que o acúmulo de oxigênio dissolvido na fase líquida (dC_L/dt) é o resultado da diferença entre a quantidade de oxigênio que se consegue dissolver (k_La (C_L* - C_L)), o suprimento de oxigênio, e o oxigênio consumido pelas células ($q_{O2}.X$), a demanda de oxigênio.

Nesse método, em um dado instante do processo fermentativo (t_0), interrompe-se a aeração, de forma a anular a transferência de oxigênio, conforme ilustrado na Figura 4.5. Recomenda-se também reduzir a freqüência de agitação, a fim de reduzir ao máximo a transferência de oxigênio na superfície do líquido. Como se pode observar, a concentração de oxigênio dissolvido no instante zero ($C_{L,0}$) começa a diminuir. Ao se atingir um certo valor $C_{0,1}$ (instante t_1), retoma-se a agitação e a aeração, nas condições que estavam sendo praticadas, observando-se, então, o aumento da concentração de oxigênio dissolvido, até atingir-se novamente o valor de $C_{L,0}$ (SCHMIDELL, 2001).

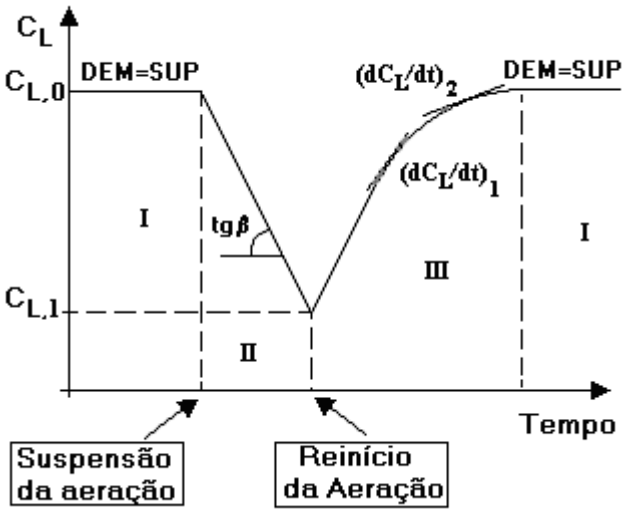

Figura 4.5. Variação da concentração de oxigênio com o tempo durante a execução do método dinâmico (SCHMIDELL, 2001).

Nessas condições, para o trecho sem aeração (Região II), deve-se observar, a partir da Eq. (4.3), que:

$$\frac{dC_L}{dt} = -q_{O2}X \qquad \therefore \qquad tg\beta = -q_{O2}X \tag{4.4}$$

o que permite determinar a taxa específica de respiração celular, q_{O2}.

Ao se retomar a aeração e agitação, antes de ser atingido o valor crítico da concentração de oxigênio, abaixo do qual o consumo de oxigênio é limitado, tem-se consumo e suprimento de oxigênio (Região III) e o balanço de oxigênio é dado pela Eq. (4.3). Considerando estado pseudo-estacionário no patamar que antecede a suspensão da aeração, pode-se considerar que:

$$k_L a\left(C_L^* - C_{L,0}\right) = q_{O2}X \tag{4.5}$$

onde $C_{L,0}$ é a concentração de oxigênio dissolvido no momento que antecede a suspensão da aeração e portanto, a Eq. (4.3) passa a ser:

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a\left(C_L^* - C_L\right) - k_L a\left(C_L^* - C_{L,0}\right) = k_L a\left(C_{L,0} - C_L\right) \tag{4.6}$$

Integrando-se a Eq. (4.6), tem-se que:

$$Ln\left(\frac{C_{L,0} - C_L}{C_{L,0} - C_{L,1}}\right) = -k_L a^*\left(t - t_1\right) \tag{4.7}$$

sendo $C_{L,1}$ e t_1 a concentração de oxigênio dissolvido e o tempo, respectivamente, quando a aeração é reiniciada.

A representação de $\ln[(C_{L,0} - C_L)/(C_{L,0} - C_{L,1})]$ em função do tempo origina uma reta cujo coeficiente angular é $-k_L a$.

4.7. Solubilidade de lipase em PFC

O extrato enzimático obtido em 45 horas de cultivo de *Y. lipolytica* em frasco de 1 L com 160 mL de meio YPD* e 40 mL de PFC, foi liofilizado após remoção das

células e da fase orgânica através de centrifugação (3 000 *g*, 15 minutos) e filtração em membrana *Millipore* (0,45 μm). O pó obtido no final da liofilização (lipase LipIMUFRJ) foi utilizado para preparação das suspensões.

A lipase extraída do meio de cultivo e liofilizada, LipIMUFRJ, e uma lipase comercial (lipase de *C. lipolytica*, *Sigma*) foram separadamente solubilizadas em água destilada em concentrações variadas, e colocadas respectivamente em frasco de erlenmeyer com 25% de perfluorodecalina sob agitação magnética a 28 ºC. Como controle, as suspensões de lipase LipIMUFRJ e de lipase comercial foram deixadas sob agitação nas mesmas condições, mas sem perfluorodecalina. Foram retiradas amostras da fase aquosa após 24 horas de agitação para varredura de comprimento de onda em spectrofotômetro (200 a 800 nm) contra um branco (água destilada).

4.8. Estabilidade da lipase obtida na presença de PFC

Para se estudar a estabilidade da lipase obtida com a adição de 20% (v/v) de PFC ao meio de cultivo de *Y. lipolytica*, todo o extrato enzimático obtido após remoção das células e da fase orgânica através de centrifugação (3 000 *g*, 15 minutos) e filtração em membrana *Millipore* (0,45 μm) do cultivo de *Y. lipolytica* em frasco de 1 L com 160 mL de meio YPD* e 40 mL de PFC por aproximadamente 45 horas, foi separado em seis diferentes frascos. Dois desses frascos foram deixados na temperatura de cultivo de *Y. lipolytica* (28º C), dois foram colocados na geladeira (4º C) e os outros dois no freezer (-4º C). Foi adicionado 0,2 mg mL^{-1} de um inibidor de serina-protease, o PMSF (fluoreto de fenil metil sulfonil), a um frasco de cada dupla para evitar a ação de proteases, possivelmente presentes no meio de cultivo, sobre a enzima de interesse, a lipase. Amostras diárias eram colhidas de cada frasco e suas atividades eram medidas pelo método espectrofotométrico na temperatura do ensaio (37º C).

4.9. Medidas de Tensão Superficial

Medidas de tensão superficial da água, perfluorodecalina e óleo de oliva e tensões interfaciais entre os mesmos foram realizadas no tensiômetro NIMA DST 9005 (*NIMA Technology*, Ltd) do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, com um anél de Pt/Ir Du Noüy, baseado em medidas de força com uma balança de precisão seguindo os procedimentos adotados por QUEIMADA *et al.*, (2005). Tais medidas

foram realizadas pelo aluno Pedro J. Carvalho, no laboratório CEFASI da Universidade de Aveiro (Portugal).

4.10. Métodos Analíticos

4.10.1. Quantificação do Crescimento Celular

O crescimento celular foi acompanhado através de medidas de absorvância em espectrofotômetro HACH DR/4000 a 570 nm e esses valores foram convertidos para mg p.s. cél/mL utilizando-se o fator de conversão obtido pela curva de peso seco, que é apresentada na Figura 4.6. A curva de peso seco é obtida através de uma suspensão de células em solução salina (água destilada com 0,9% (p/v) de NaCl). Desta suspensão, retira-se uma amostra (10 mL), que é filtrada em papel de filtro Millipore (0,45 μm), seca em luz de infravermelho por 30 minutos e, em seguida, pesada. Da mesma suspensão são feitas diferentes diluições de modo a se obter concentrações celulares distintas e então mede-se a absorvância em espectrofotômetro a 570 nm, obtendo-se a curva de peso seco.

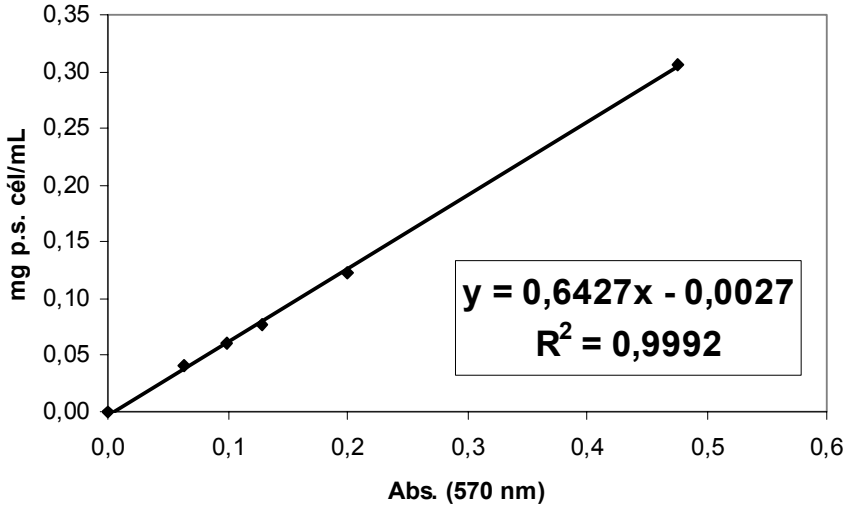

Figura 4.6. Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* através de medidas de absorvância em espectrofotômetro HACH DR/4000.

4.10.2. Determinação de Glicose

A concentração de glicose presente do meio de cultivo foi medida pelo método da glicose oxidase utilizando um *kit* enzimático para medida colorimétrica de glicose (*HUMAN GmbH - Germany*).

Nesse método, a absorvância da reação enzimática é medida em espectrofotômetro a 500 nm, contra o branco de reação, que é composto apenas pelo Reagente Enzimático. Tomam-se alíquotas de 15 μL de amostra e completa-se com 1500 μL de Reagente Enzimático. Após a homogeneização, incuba-se por 10min a 37°C, sendo a absorbância da amostra e do padrão mensuradas em no máximo 60 minutos.

O padrão de glicose pertencente ao *kit* enzimático possui uma concentração de 100 mg.dL^{-1} e o Reagente Enzimático contém: tampão fosfato (pH 7,5) 100 mmol.L^{-1}; 4-aminofenazona 0,25 mmol.L^{-1}; Fenol 0,75 mmol.L^{-1}; Glicose oxidase 15000 U.L^{-1}; Peroxidase 1500 U.L^{-1}; Mutarotase 2000 U.L^{-1}.

O cálculo de concentração de glicose é realizado através da Eq. (4.8):

$$C = 100 * \left(\frac{Aa}{Ap} \right) \tag{4.8}$$

onde:

Aa = Absorvância da amostra;

Ap = Absorvância do padrão;

C = concentração de glicose na amostra (mg.dL^{-1})

4.10.3. Determinação da Atividade Lipásica

A atividade da lipase foi medida através dos métodos, espectrofotométrico e titulométrico. O primeiro é mais simples e rápido e, portanto, foi adotado mais freqüentemente. No entanto, pelo fato do substrato utilizado ser um éster, pode detectar a presença de outras esterases, além das lipases. Desta forma, o método titulométrico foi utilizado para confirmação de que lípases, e não esterases, estavam sendo medidas pelo primeiro método.

4.10.3.1. Método Espectrofotométrico

A atividade da lipase foi estimada mediante a variação de absorvância a 410 nm em espectrofotômetro (HACH, DR-4000) devido à oxidação do *p*-nitrofenil laurato (*p*-NFL) com uma concentração de 0,162 $mg.mL^{-1}$ em tampão fosfato de potássio (0,05 M), pH 7,0 (PEREIRA-MEIRELLES, 1997).

O substrato (*p*-NFL) é preparado solubilizando 0,018 g deste em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, uma alíquota é diluída 100 vezes em tampão fosfato de potássio (0,05 M). Um tubo de ensaio contendo 1,8 mL do substrato previamente preparado é aclimatado a 37ºC por, aproximadamente, 15 minutos. Após esse tempo, é adicionado 0,2 mL do sobrenadante do meio de cultura e a absorvância acompanhada em espectrofotômetro a 410 nm contra o branco de reação (0,2 mL do tampão fosfato de potássio adicionados a 1,8 mL do substrato).

O cálculo da atividade é realizado utilizando a Eq. (4.9):

$$A = \frac{(\Delta Abs) * D * f * V_r}{(\Delta t) * V_s} \tag{4.9}$$

onde:

A = atividade da enzima ($U.L^{-1}$), onde *1 Unidade enzimática (1U) corresponde a quantidade de enzima capaz de produzir 1μmol de p-nitrofenol por minuto nas condições de ensaio*;

ΔAbs = variação de absorvância no intervalo de tempo Δt (em minutos) transcorrido durante a fase de aumento linear da absorvância;

D = diluição da solução enzimática;

V_r = volume reacional, que é o volume da solução de p-NPL em tampão e o volume da amostra, em litros;

V_s = volume da solução enzimática utilizada no ensaio, em litros;

f = fator de conversão (245 μmol/L), obtido através da construção de uma curva padrão de *p*-NFL em concentração variando entre 0,01 e 0,2 $\mu mol.mL^{-1}$.

4.10.3.2. Método Titulométrico

Segundo DELLMORA-ORTIZ *et al.* (1997) a determinação da atividade lipásica pelo método titulométrico pode ser realizada utilizando 5 mL de emulsão de óleo de oliva 20% (v/v) em goma arábica 5% (p/v) (Substrato) e, 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0. O ensaio é realizado sob agitação magnética, a 37ºC, sendo iniciado pela adição de 3 mL da preparação enzimática, previamente aquecida à temperatura de ensaio. Após 15 minutos de incubação, a reação é paralisada pela adição de 10 mL de uma mistura etanol e acetona (1:1).

Os ácidos graxos formados pela hidrólise dos triacilgliceróis presentes na emulsão foram quantificados pela titulação contra NaOH 0,025 N, utilizando fenolftaleína como indicador.

Também foi utilizado um branco, pela inativação da enzima por adição prévia da mistura etanol-acetona ao meio reacional.

Uma unidade de atividade enzimática (1U) corresponde à quantidade de enzima que produz 1 µmol de ácido graxo por minuto, nas condições de ensaio.

4.10.4. Determinação da Atividade Proteásica

A medida de atividade de protease foi realizada segundo PINTO (1998). O extrato enzimático era adicionado a uma solução de azocaseína 0,5 % em tampão acetato 50 mM, pH 5,0 em iguais proporções (1,0 mL) e a mistura incubada por 40 minutos a 32ºC. Após esse tempo, adiciona-se 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA), objetivando a precipitação de proteínas não hidrolisadas pela protease. Em seguida, centrifuga-se a amostra (3.000 *g*, 10 minutos) e 2,0 mL do sobrenadante eram transferidos para um novo tubo ao qual se adiciona 2,0 mL de KOH 5 N. A reação gera uma cor laranja, característica dos grupamentos azo em pH alcalino e a intensidade desta coloração foi medida em espectrofotômetro HACH DR-4000 a 428 nm, contra um branco.

O branco de reação foi obtido pela adição de TCA antes da adição do extrato enzimático.

O cálculo da atividade é realizado utilizando a Eq. (4.10):

$$A = \frac{\left(Abs_{amostra} * f_{amostra} - Abs_{branco} * f_{branco}\right)}{t * V_{amostra}} \tag{4.10}$$

onde:

A = atividade da enzima (U L^{-1}), onde *uma unidade de atividade (1U) corresponde à diferença unitária de absorvância a 428 nm por minuto de reação entre a amostra e o branco de reação nas condições de reação.*

Abs_i = absorvância de i;

f_i = diluição de i;

$V_{amostra}$ = volume de amostra (L);

t = tempo de reação (min).

4.11. Caracterização da Superfície Celular de *Y. lipolytica*

Para analisar as interações entre as células de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 e o PFC foram realizados alguns testes para verificar os mecanismos envolvidos no contato entre as duas fases, como a análise das propriedades hidrofóbicas e ácidas ou básicas da parede celular da levedura estudada. Tais análises são descritas nos itens a seguir. Alguns testes foram também realizados com células de *Y. lipolytica* W29 e com células de *S. cerevisiae* ATCC 32167 de forma a comparar os resultados. Quando não indicado no texto, o resultado se refere a *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682.

4.11.1. Preparação das Amostras

Para todos os métodos utilizados para caracterizar a superfície celular de *Y. lipolytica*, as amostras foram coletadas e preparadas da seguinte forma: células do pré-inóculo (cultivadas por 70 horas em *Erlenmeyres* de 500 mL com 200 mL de meio YPD) ou do cultivo descrito eram centrifugadas (3.000 *g*, 10 minutos), lavadas duas vezes com água destilada e ressuspensas em tampão ou em solução determinada pelo método em questão. Esse procedimento era efetuado para garantir a remoção completa de qualquer substância que não estivesse ligada covalentemente à superfície celular, em particular, um possível surfactante.

4.11.2. Adesão de Células a Superfícies Hidrofóbicas

4.11.2.1. Adesão a poliestireno

Este teste é baseado na suposição de que existe uma correlação entre a hidrofobicidade das células e sua adesão ao poliestireno, como foi proposto por ROSENBERG (1981). Um mililitro de uma suspensão celular com uma concentração fixa preparada em tampão fosfato de potássio é adicionado em uma placa de Petri de poliestireno. Para se estudar a influência da força iônica e do pH, variou-se a força iônica do tampão de 10^{-4} a 10^{-1} M, e o valor de pH de 3,0 a 9,0. Após 24 horas de repouso, o sobrenadante é removido pela inserção da placa, por 10 vezes, em um Becher de 2 L contendo 1,5 L de água destilada com agitação de 1000 rpm. Deixa-se secar por 2 horas para posterior observação em microscópio ótico (aumento total de 1000x) e quantificação da adesão celular por análise de imagem, que será descrito no item 4.11.2.3.

O mesmo procedimento foi realizado com lâminas de microscópio vidro, que apresenta menor hidrofobicidade que o poliestireno.

Algumas outras superfícies com graus de hidrofobicidade diferentes foram utilizadas no lugar da placa de Petri de poliestireno e o mesmo teste de adesão de células descrito acima foi realizado. O preparo dessas superfícies será descrito a seguir.

4.11.2.2. Filmes de Organosilicone e do Tipo Teflon

A deposição dos filmes de organosilicone ou do tipo teflon foram feitas usando descarga de plasma em superfície à pressão atmosférica desenvolvida no Departamento de Física Eletrônica, da Faculdade de Ciências da Universidade de Masaryk na República Checa pelo Dr. Pavel Stahel. Nitrogênio com alta pureza foi utilizado como gás de descarga. Para os filmes de organosilicone foram utilizadas diferentes vazões de alimentação de Hexametildisiloxano (HMDSO) ($C_6H_{18}Si_2O$): 0,064; 0,087; 0,115 e 0,170 g/s em diferentes tempos de deposição: 30; 60; 90 e 120 s. Para os filmes do tipo teflon foram utilizadas diferentes vazões de alimentação de Octafluorociclobutano (C_4F_8): 0,2; 0,3; 0,4 e 0,6 g/s em diferentes tempos de deposição: 30; 60; 90 e 120 s. As finas camadas de HMDSO ou C_4F_8 foram depositadas em placas de policarbonato comerciais. A caracterização de tais superfícies foi realizada por medidas de ângulo de contato.

4.11.2.3. Análise de Imagem

Várias imagens de diferentes partes de cada placa contendo as células que resistiram ao tratamento descrito no item 4.11.2.1 foram registadas através da utilização de um microscópio óptico, *Olympus*, modelo BX51 com uma câmara de fotografia digital, *Olympus,* acoplada. A ampliação utilizada foi de 1000x do microscópio óptico e 4x do *zoom* óptico da máquina fotográfica digital, que perfaz uma ampliação de 4000x. As imagens recolhidas foram posteriormente tratadas através da medição da área ocupada pelas células (em pixels) com uma rotina computacional desenvolvida em MatLab® 6.1 (MATH WORKS INC., 1997). Para cada placa foram registradas em torno de 10 imagens.

O programa desenvolvido para determinar o diâmetro das micelas de emulsões (FREIRE *et al.*, 2005) foi adaptado para determinar a área ocupada pelas células. Este programa é dividido em três componentes principais: a binarização das imagens obtidas, a quantificação da área e o cálculo de parâmetros estatísticos.

A binarização consiste na conversão da imagem obtida para uma imagem a preto e branco, com o seu subsequente tratamento de forma a eliminar possíveis ruídos. Desta forma transforma-se uma matriz com três dimensões em uma matriz com duas dimensões composta simplesmente por elementos 0's (pixies *off*) e 1's (pixeis *on*). A segunda componente do programa efetua a quantificação das células, apresentando resultados como diâmetro, diâmetro ao cubo, área e cicularidade. Por último existe uma componente que reúne os dados de um determinado número de imagens já quantificadas anteriormente fornecendo como resultado final o número de objetos analisados, o desvio padrão da medição do diâmetro, o diâmetro médio final e a área total ocupada por células e a área não ocupada.

4.11.3. Cromatografia de Interação Hidrofóbica (CIH)

Esse teste consiste em medir a quantidade de células retidas por um gel hidrofóbico (MOZES e ROUXHET, 1987). Coloca-se 0,6 mL de fenil sefarose em uma pipeta *Pasteur*, equilibrando com uma solução de NaCl 4M em diferentes pHs (3-7), fixados com tampão citrato 0,1 M. Uma amostra de 0,1 mL de uma suspensão de células preparada em NaCl 4M é introduzida no gel e, em seguida, 3 mL da solução de equilíbrio passa através da coluna. A absorvância da fração recolhida é determinada (A_0). Posteriormente, 3 mL de tampão citrato 0,1 M no mesmo pH que a solução de equilíbrio, mas sem NaCl, são introduzidos na coluna e os valores de absorvância são anotados, a cada 3 mL adicionados, como A_i. Adicionalmente, 0,1 mL da suspensão de

células original é diluída em 3 mL de NaCl 4M e a absorvância é determinada (A_t), que deve ser entre 0,5 e 0,7. As absorvâncias são medidas a 570 nm.

Os dados permitem a determinação da proporção de células retidas pelo gel na presença de alta força iônica (R_A), que favorece a observação de interações hidrofóbicas, e a proporção de células retidas pelo gel em baixa força iônica (R_B), como mostram as Eq. (4.11) e (4.12).

$$R_A = 100*(A_t - A_0)/A_t \quad (4.11)$$

$$R_B = 100*(A_t - \Sigma A_i)/A_t \quad (4.12)$$

4.11.4. Adesão Celular à Solventes

Os testes de adesão de células a solventes se baseiam na comparação entre a afinidade da superfície celular à água e à determinados solventes.

4.11.4.1. Teste MATS (*microbial adhesion to solvents* - adesão microbiana à solventes)

Este teste determina as propriedades doadoras/aceptoras de elétrons (ácido/base de Lewis) da parede celular dos microrganismos (BELLON-FONTAINE *et al.*, 1996). A técnica é baseada na afinidade celular microbiana a solventes monopolares e apolares. Os solventes monopolares podem ser ácidos (aceptor de elétrons) ou básicos (doador de elétrons), mas os dois solventes devem ter componentes similares de tensão superficial Lifshitz-van der Waals. Os pares de solventes que utilizados foram:

- Clorofórmio, um solvente ácido que não apresenta caráter básico quando puro (aceptor de elétrons) e hexadecano;
- Acetato de etila, um solvente fortemente básico (doador de elétrons) e decano.

As propriedades de tensão superficial dessas substâncias estão apresentadas na Tabela 4.3.

Nesse teste as células do cultivo são ressuspensas em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) para medida de absorvância a 570 nm (A_0), que deve ser, aproximadamente, 0,7. Essa suspensão celular (3,6 mL) é adicionada a um tubo de vidro contendo 0,6 mL de

solvente e, em seguida, o tubo é agitado em vortex por 50 segundos. Após 10 minutos, determina-se a absorvância da fase aquosa a 570 nm (A). Os resultados são dados em percentual de células aderidas, segundo a Eq. (4.13):

$$\% \text{ adesão} = 1 - A/A_0 \tag{4.13}$$

Tabela 4.3. Propriedades de tensão superficial dos solventes utilizados no teste MATS (BELLON-FONTAINE *et al.*, 1996).

Líquido	Fórmula	γ^{LW} [mJ m^{-2}]	γ^{+} [mJ m^{-2}]	γ^{-} [mJ m^{-2}]
Clorofórmio	$CHCl_3$	27,2	3,8	0
Hexadecano	$C_{16}H_{34}$	27,7	0	0
Acetato de Etila	$C_4H_{10}O$	23,9	0	19,4
Decano	$C_{10}H_{22}$	23,9	0	0

4.11.4.2. Teste MATH (*microbial adhesion to hydrocarbon* - adesão microbiana à hidrocarbonetos)

O teste consiste na comparação entre a afinidade celular microbiana a hidrocarbonetos. Como o teste original foi criticado por não ser suficientemente quantitativo, pois negligenciava efeitos cinéticos, uma avaliação dinâmica MATH foi proposta por VAN DER MEI *et al.* (1995).

Para analisar essa afinidade aos hidrocarbonetos as células são suspensas em varias soluções tampão com pHs ajustados para 2, 3, 4, 5, 7 e 9 e as suspensões formadas são submetidas a medida de absorvância a 570 nm (A_0), que deve ser, aproximadamente, 0,7.

Os tampões usados foram: PUM (19.7 g L^{-1} K_2HPO_4, 7.26 g L^{-1} KH_2PO_4, 1.8 g L^{-1} H_2NCONH_2 and 0.2 g L^{-1} $MgSO_4.7H_2O$), PBS (0.87 g L^{-1} K_2HPO_4, 0.68 g L^{-1} KH_2PO_4, and 8.77 g L^{-1} NaCl), KPi (0.87 g L^{-1} K_2HPO_4, and 0.68 g L^{-1} KH_2PO_4).

Em seguida, 0,15 mL de hidrocarboneto (tolueno, *n*-hexadecano, *p*-xileno) é adicionado a 3 mL da suspensão bacteriana e o sistema é agitado em vortex por 10 s. Depois de 10 min em repouso, mede-se a absorvância da suspensão aquosa (A). O último passo é repetido 10 vezes em 10 tempos de agitação em vortex (até 1 min) e os valores de log (A/A_0*100) são colocados em um gráfico relacionados com o tempo de agitação em vortex. Um ajuste linear desses pontos fornece a taxa de adesão inicial (TA_0, em minutos) como uma medida de adesão de células ao hidrocarboneto.

4.11.5. Medida do Ângulo de Contato

O ângulo de contacto (θ) formado por uma gota de líquido sobre uma superfície sólida está diretamente relacionado com a molhabilidade da superfície por esse líquido. Existem vários métodos para a medição do ângulo de contacto sólido/líquido, no entanto, de acordo com BUSSCHER *et al*. (1984), o método mais fácil de utilizar é o da gota séssil.

O teste para medir o ângulo de contato na superfície de microrganismos consiste em depositar uma gota de um líquido em um filme de células e determinar o ângulo formado entre a superfície do filme e a tangente à gota no ponto de encontro do sólido, líquido e ar.

O filme de células é preparado coletando as células em uma membrana de celulose triacetato (Millipore), com diâmetro de poro de 0,45 μm, obtendo-se em torno de 10^8 células/mm^2. Para padronizar o conteúdo de umidade, os filtros com as células são colocados em uma placa de Petri na superfície de Agar (1% p/v em água contendo 10% (v/v) de glicerol) até a realização da medida (BUSSCHER *et al*., 1984).

O ângulo de contato das amostras preparadas foi medido pela técnica da gota séssil (*sessile drop technique*) utilizando o aparelho OCA 15 Plus, *Dataphysics* (Figura 4.7), do laboratório dirigido pela Professora Maria Helena Mendes Gil da Universidade de Coimbra. Este aparelho conta com um sistema de aquisição de imagens através de uma câmera de vídeo (Figura 4.7, A), uma seringa controlada através do computador (Figura 4.7, B e C) e uma base para colocação da amostra (Figura 4.7, D). O sistema de aquisição de imagens está conectado a um computador e, através de um *software*, as imagens do momento em que a gota do líquido toca a superfície (Figura 4.8) são processadas para obtenção do ângulo de contato.

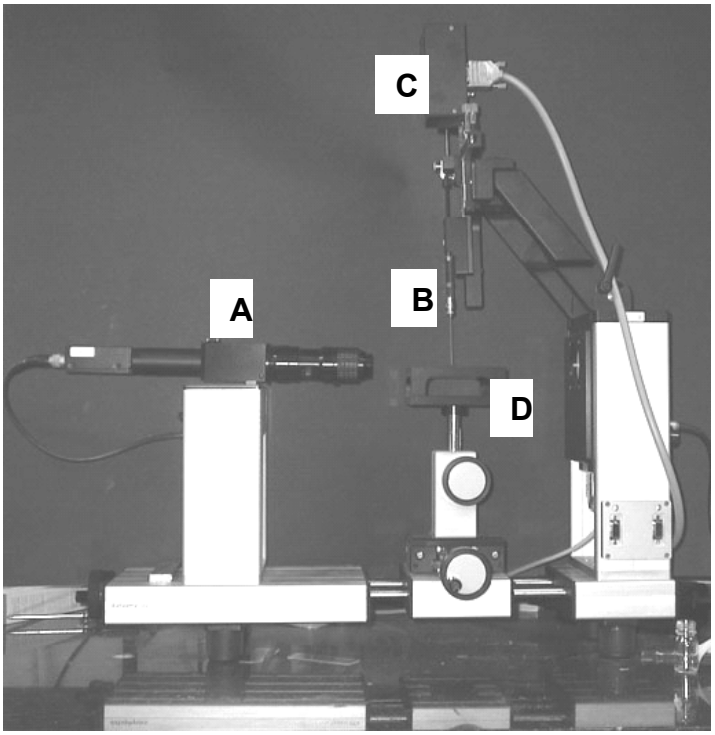

Figura 4.7. Aparelho de medida de ângulo de contato OCA 15 plus (*Dataphysics*). (A) Câmera de vídeo; (B) Seringa; (C) Controle automático da seringa,; (D) base para colocação da amostra.

Figura 4.8. Imagem registrada pelo sistema de aquisição de imagens do aparelho OCA 15 plus (*Dataphysics*) no momento em que a gota de líquido toca a superfície.

A medida foi realizada em temperatura ambiente utilizando três líquidos com tensão superficial conhecidas: água, formamida e diiodometano, como mostra a Tabela 4.4. Os ângulos obtidos nos filmes de células com esses três líquidos permitiram o cálculo da tensão superficial total, (γ^{tot}) e seus componentes: Lifshitz-van der Waals (γ^{LW}) e Lewis ácido-base (γ^{AB}), que por sua vez tem um componente positivo (γ^{+}) e negativo (γ^{-}), através da equação de Young-Good-Girifalco-Fowkes (VAN OSS *et al.*, 1987):

$$(1+\cos\Theta)\gamma_l = 2\left(\sqrt{\gamma_l^{LW}\gamma_s^{LW}} + \sqrt{\gamma_l^{+}\gamma_s^{-}} + \sqrt{\gamma_l^{-}\gamma_s^{+}}\right) \quad (4.14)$$

sendo que *l* e *s* correspondem a líquido e sólido, respectivamente. Obtém-se, portanto: os componentes γ^{LW}, γ^{+}e γ^{-} para o sólido.

Tabela 4.4. Valores das componenets de tensão superficial dos líquidos utilizados na medida de ângulo de contato (RIJNAARTS *et al.* 1995).

Líquido	γ^{TOT} [mJ m^{-2}]	γ^{LW} [mJ m^{-2}]	γ^{AB} [mJ m^{-2}]	γ^{+} [mJ m^{-2}]	γ^{-} [mJ m^{-2}]
Água	72,8	21,8	51,0	25,5	25,5
Formamida	58,0	39,0	19,0	2,28	39,6
Diiodometano	50,8	50,8	0	0	0

A tensão superficial, γ^{tot}, de acordo com VAN OSS (1995) resulta da soma de duas componentes (γ^{LW} e γ^{AB}), ou seja:

$$\gamma^{TOT} = \gamma^{LW} + \gamma^{AB} \tag{4.15}$$

γ^{LW} é a componente apolar (interação de *Lifshitz-van der Waals*), cujo valor resulta da resolução da Eq. (4.14); γ^{AB} é a componente polar (interação de ácido base de Lewis) e é determinada por:

$$\gamma^{AB} = 2\sqrt{\gamma^{+}\gamma^{-}} \tag{4.16}$$

em que γ^{+} representa o parâmetro da tensão superficial devida à capacidade da substância aceitar elétrons e γ^{-} corresponde à tensão superficial devida à capacidade de ceder elétrons.

Os valores da energia de interação entre as células e a água (ΔG_{mwm}) puderam ser calculados de acordo com VAN OSS (1995).

$$\Delta G_{mwm} = -2\left(\sqrt{\gamma_m^{LW}} - \sqrt{\gamma_w^{LW}}\right)^2 - 4\left(\sqrt{\gamma_m^{+}\gamma_m^{-}} + \sqrt{\gamma_w^{+}\gamma_w^{-}} - \sqrt{\gamma_m^{+}\gamma_w^{-}} - \sqrt{\gamma_m^{-}\gamma_w^{+}}\right) \tag{4.17}$$

em que *m* significa microrganismo e *w* representa o sistema aquoso.

Esta metodologia foi aplicada também para caracterização das superfícies utilizadas no teste de Adesão de Células a Superfícies Hidrofóbicas (item 4.11.2).

4.11.6. Potencial Zeta

O potencial zeta eletrocinético foi analisado em um instrumento do tipo *Coulter delsa* 440SX. A medida foi realizada em células lavadas e ressuspensas em solução aquosa de KCl (0,1 M).

Essa análise foi realizada pelo técnico Jorge Corker do Laboratório de Análises Térmicas do Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro da Universidade de Aveiro (Portugal).

4.11.7. Tratamento com Pronase

Nesse teste as células do cultivo são ressuspensas em tampão Tris-HCl 0,01 M em concentração suficiente para obter uma absorvância a 570 nm de 0,1 após diluição de 10 vezes. A Pronase foi adicionada a suspensão celular em concentração de 0,1 $mg.mL^{-1}$ e as células foram recolhidas após incubação em *shaker* com agitação de 100 rpm a 37ºC por um período de tempo determinado (TAE-HYUM *et al.*, 2000). As células tratadas com pronase foram submetidas aos testes MATS, CIH e adesão a poliestireno.

4.11.8. XPS (Espectroscopia Fotoeletrônica de raios-X, **X-Ray Photoelectron Spectroscopy***)*

As amostras para análise de XPS foram preparadas segundo VAN DER MEI *et al*. (2000), como mostra a Figura 4.9.

A análise de XPS foi realizada utilizando um filme de células depositado em uma placa de vidro utilizando o espectrômetro Perkin-Elmer 1257. Para a análise, foi utilizada uma fonte de raios-X Al (Ka) acromática operando a 15 kV (300 W) e um espectrômetro calibrado com referência a Ag $3d_{5/2}$ (368.27 eV) e operado com 20 eV de energia. A aquisição de dados foi realizada com pressão menor que 1.E-6 Pa. A análise do espectro foi feita utilizando o ajuste de pico com a forma Gaussiana-Lorentzian.

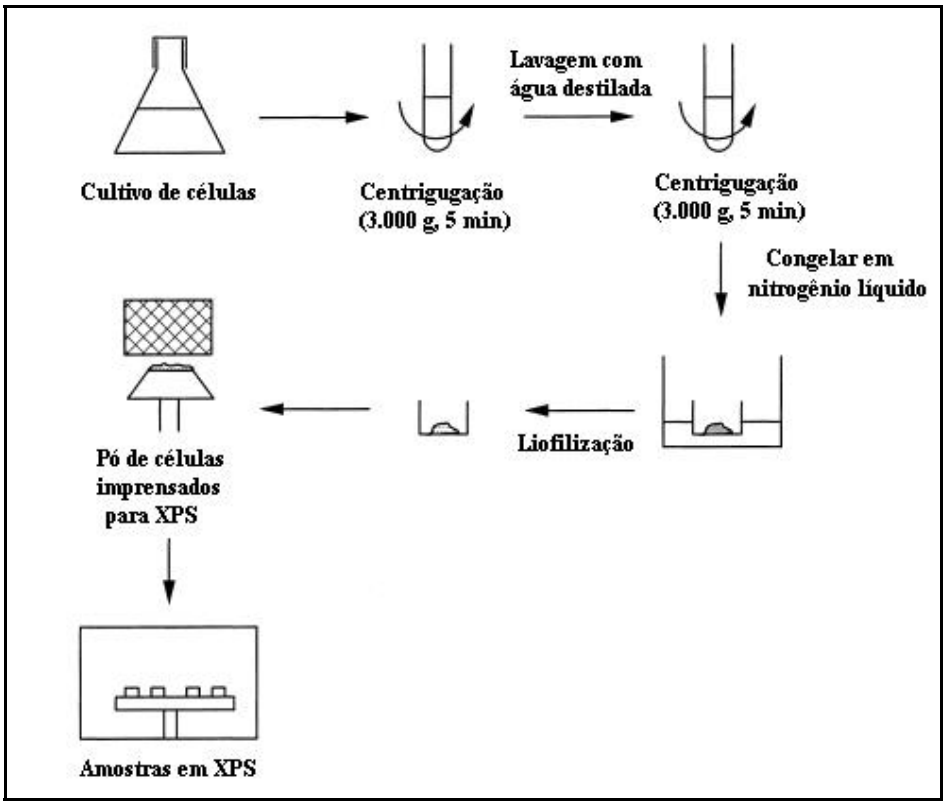

Figura 4.9. Esquema de preparo de amostras para análise de XPS (adaptado de VAN DER MEI *et al*., 2000).

Essa análise foi realizada pelo técnico M.Sc. Carlos André de Castro Perez do NUCAT/COPPE/UFRJ.

4.12. Detecção e Purificação do Emulsionante produzido por *Y. lipolytica*

Além da caracterização da superfície celular de *Y. lipolytica* para se analisar as interações entre as células e o PFC, investigou-se também a produção de atividade emulsionante por essa levedura, pois agentes emulsionantes podem estar envolvidos na interação de células com compostos hidrofóbicos. Como foi detectada a presença de um emulsionante no meio de cultivo de produção de lipase por *Y. lipolytica*, este emulsionante foi também purificado e caracterizado através das técnicas descritas nos itens a seguir.

Para efeito de comparação, outros agentes emulsionantes foram também caracterizados utilizando as mesmas técnicas. São eles: *Tween 80*, *Span 20*, *Pluronic F-68*, goma arábica e goma xantana.

4.12.1. Atividade Emulsionante

A atividade emulsionante era medida utilizando a técnica descrita por CIRIGLIANO e CARMAN (1984). Para medida de atividade emulsionante do meio de cultivo, eram retiradas amostras de tempos em tempos, que eram centrifugadas (3.000 *g*) por 5 minutos e 2 mL do sobrenadante eram colocados em um tubo de vidro com tampa de rosca e diluídos com 2 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 3,0. Para a medida de atividade emulsionante do emulsionante purificado (em pó, que será descrito no item a seguir) ou dos surfactantes comerciais, 30 mg do surfactante eram dissolvidos em 4 mL do mesmo tampão.

Para os dois tipos de análises, 750 mg de hexadecano eram adicionados e a mistura era agitada em vortex por 2 minutos. Deixava-se a emulsão formada em repouso por 10 minutos e, em seguida, media-se a absorvância a 540 nm em espectrofotômetro (*Jenway 6300 Spectrophotometer*). O branco da medida continha 2 mL de meio YPD* e 2 mL de tampão (para a medida da atividade do meio de cultivo) ou 4 mL de tampão acetato de sódio (para a medida da atividade do surfactante purificado).

Uma unidade de atividade emulsionante é definida pela quantidade de emulsionante que faz a absorvância da emulsão variar uma unidade a 540 nm nas condições descritas.

A medida de atividade emulsionante foi realizada também substituindo o hexadecano por outros hidrocarbonetos (Hexano, Heptano, Decano, Tetradecano, Parafina líquida, Tolueno, Xileno, Estireno) e alguns perfluorocarbonetos (perfluorooctano, perfluorononano, perfluorodecalina, perfluorotolueno e hexafluorobenzeno) de modo a identificar a influência do tipo de solvente no poder emulsionante dos surfactantes.

4.12.2. Estabilidade da Emulsão

Para medir a estabilidade das emulsões formadas durante a medida de atividade emulsionante, a absorvância da emulsão formada era medida a cada 10 minutos durante 50 minutos. Através do gráfico obtido pelo logaritmo da absorvância *versus* tempo, obtém-se a constante de decaimento, k_d,pela inclinação da curva.

O efeito do pH na atividade emulsionante foi estudada utilizando o tampão acetato de sódio em diferentes valores de pH. O efeito da fase orgânica na estabilidade

da emulsão foi estudado substituindo o hexadecano por 750 mg de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos assim como perfluorocarbonetos.

4.12.3. Mecanismos de Envelhecimento de Emulsões formadas com Yansan

Para se estudar os mecanismos de envelhecimento de emulsões foram preparadas emulsões com *n*-hexadecano em combinação com dois emulsionantes: Yansan e Goma arábica. O efeito da concentração da fase orgânica foi estudado utilizando 15 e 30 % (p/v) de *n*-hexadecano e uma concentração fixa de emulsionante, 0,6 % (p/v). O emulsionante era solubilizado previamente em tampão fosfato 0,1 M, pH 3,0 ou 7,0. As emulsões foram preparadas por sonicação, utilizando um sonicador *Vibra Cell*™ (*Sonics*), em dois ciclos de dois minutos, mantndo-se em banho de gelo para evitar o aumento de calor. As emulsões foram mantidas em estufa a 29 ºC por 60 dias.

O tamanho das micelas das emulsões foi analisado periodicamente através de imagens obtidas por uma câmera digital (*Olympus*) acoplada e a um microscópio ótico (*Olympus*, modelo BX51). Cada imagem era analisada e o tamanho da micela quantificado através de uma rotina computacional desenvolvida em MatLab® 6.1 (MATH WORKS INC., 1997). Foi utilizado o programa desenvolvido para determinar o diâmetro das micelas de emulsões (FREIRE *et al*., 2005). Para cada amostra em torno de 1000 micelas eram analisadas através da analise de 20 imagens. Um micrômetro e um software apropriado, Image-Pro Plus 5.0, foram utilizados para calibração do tamanho das micelas.

4.12.4. Purificação do Emulsionante

A técnica de isolamento do surfactante foi adaptada de CIRIGLIANO e CARMAN (1985). Após o cultivo de *Y. lipolytica* por 170 h em frasco de Erlenmeyer de 500 mL com 200 mL de meio YPD* agitado a 250 rpm, as células foram centrifugadas (26.000 *g*) a 25ºC por 20 minutos e depois, filtradas em uma membrana de celulose triacetato (Millipore) de 0,45 µm.

Aproximadamente 150 mL do extrato filtrado era transferido para uma membrana de diálise com 110 cm de comprimento, diâmetro de 4 cm e corte molecular de 12.000 Da. O extrato era concentrado para 25 mL por evaporação durante aproximadamente 24 horas) e, em seguida, esse volume era colocado em um funil de separação de 500 mL com 175 ml de uma mistura de clorofórmio e metanol (4:3). Após

agitação, o precipitado branco formado na fase aquosa era centrifugado (32.000 *g*) a 4ºC por 30 minutos, ressuspenso em água e liofilizado.

4.12.5. Medida de Ângulo de Contato

A medida do ângulo de contato foi realizada como descrito anteriormente (item 4.11.5), apenas adaptando a preparação da amostra. A preparação da amostra foi realizada segundo HENRIQUES *et al.* (2002), espalhando 2 mL de uma solução aquosa do emulsionante (50 $mg.mL^{-1}$) sobre uma placa de vidro, cobrindo toda a superfície. Após secagem à temperatura ambiente por 10 a 15 horas, outras duas camadas da solução de emulsionante eram adicionadas seguindo o mesmo procedimento. Sobre essa superfície era realizada a medida.

4.12.6. Concentração Micelar Crítica (CMC)

A concentração micelar crítica (CMC) foi determinada por titulação turbidimétrica (ABED *et al.*, 2004). Quinze mililitros de uma solução contendo 10 $mg.mL^{-1}$ de emulsionante foram colocados em um *Becker* sob agitação magnética moderada. Essa solução era diluída pela adição de volumes de água destilada determinados.

A mudança na transmitância da solução foi monitorada utilizando um espectrofotômetro (*Jenway 6300 Spectrophotometer*) operando a 450 nm, obtendo-se assim, uma curva de transmitância em função da concentração do emulsionante, como mostra a Figura 4.10. O valor de turbidez permanece aproximadamente sem variações em relação a concentração de emulsionante até que um determinado valor de concentração é atingido, no qual a mudança na inclinação da curva de turbidez *versus* concentração indica o momento em que se inicia a formação de micelas. É nesse ponto que se obtém o valor de CMC.

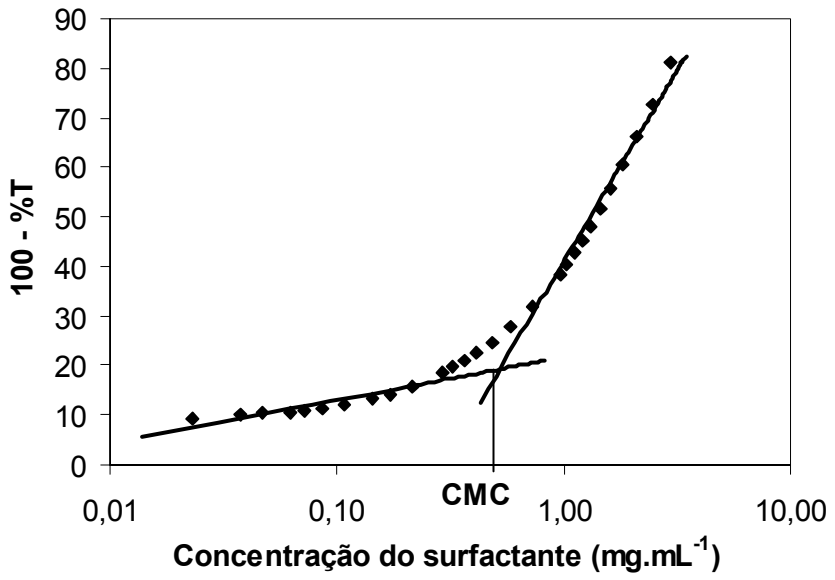

Figura 4.10. Exemplo de uma curva de trasmitância *versus* concentração de surfactante em que se determina a CMC do surfactante.

4.12.7. Potencial Zeta

O potencial zeta eletrocinético foi analisado em um instrumento do tipo *Coulter delsa* 440SX. A medida foi realizada em uma suspensão com 100 mg de emulsionante purificado em 5 mL de uma solução aquosa de KCl (0,001 M).

Essa análise foi realizada pelo técnico Jorge Corker do Laboratório de Análises Térmicas do Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro da Universidade de Aveiro (Portugal).

4.12.8. Conteúdo Protéico

Os reagentes da quantificação de proteína reportada por LOWRY (1951) são: REAGENTE A: 1 ml de $CuSO_4$ 1% (p/v); 1 ml de solução de tartarato duplo de Na e K 2% (p/v); Completar com solução de $NaCO_3$ 2% em NaOH (0,1 N) até 100 ml. REAGENTE B: Solução de Folin-Ciocalteau diluída 2 vezes em água destilada.

A determinação de proteína é realizada juntando 0,5 ml da amostra (ou água destilada no caso do branco) com 2 ml de Reagente A. Deixa-se 10 minutos na temperatura ambiente e, em seguida, adiciona-se 0,2 ml do Reagente B. Depois de 30 minutos na temperatura ambiente é feita a leitura em espectrofotômetro a 660 nm.

A curva padrão é feita com diferentes diluições de uma solução de albumina de soro bovino (BSA) na concentração inicial de 0,1 mg/mL.

4.12.9. Composição de Monossacarídeos

Os açúcares neutros foram determinados por cromatografia gás-líquido depois de hidrólise com ácido sulfúrico (SELVENDRAN *et al.*, 1979) e conversão em seus acetatos (BLAKENEY *et al.*, 1983) em um cromatográfico a gás *Carlo Erba* 6000 equipado com um injetor split (razão de separação 1:60) e um detector de ionização de chama (FID). A coluna usada foi DB-225 J&W (30 m x 0.25 mm (d.i.), 0.25 μm de espessura de filme).

4.12.10. Composição de Ácidos Graxos

Antes da análise por GC-MS, as amostras sofreram um pré-tratamento segundo FREIRE *et al.* (2003). A análise GC-MS foi realizada utilizando Cromatógrafo *Trace Gas* série 2000 equipado com um espectrômetro de massa *MS Finnigan Trace*, utilizando hélio como gás carreador (35 cm/s), equipado com uma coluna capilar DB-1 J&W (30 m × 0.32 mm (d.i.), 0.25 μm de espessura do filme).

A análise da composição de ácidos graxos foi realizada por Armando Silvestre do Departamento de Química (Universidade de Aveiro, Portugal).

4.12.11. Caracterização Química

O espectro FTIR foi gravado utilizando o FTIR *Mattson* 7000. As medidas de absorvância no visível foram realizadas no espectrômetro *Jasco* V560. O espectro FT-Raman foi realizado no espectrômetro *Bruker RFS* 100/S. O espectro NMR foi realizado no espectrômetro *Bruker MSL* 400.

A análise de XPS (*Espectroscopia Fotoeletronica de raios-X*) foi realizada como descrito em 4.11.8, sobre um filme formado pela deposição de uma suspensão do bioemulsionante sobre a placa de vidro.

Essas análises foram realizadas pelo Dr. Carlos P.M. Sá do Centro de Materiais da Universidade do Porto (Portugal).

5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE PFC NO CULTIVO DE *YARROWIA LIPOLYTICA* E NA PRODUÇÃO DE LIPASE

5.1. O Efeito do PFC no Cultivo de *Yarrowia lipolytica*

Os efeitos da adição de 10 e 20% (v/v) de perfluorodecalina foram avaliados para o cultivo de *Yarrowia lipolytica* em frascos (*Erlenmeyers*) de 500 mL com 200 mL de meio de cultivo, agitados sob duas velocidades de agitação diferentes (160 rpm e 250 rpm).

Analisando os resultados da Tabela 5.1 é possível observar que a adição de PFC no cultivo de *Y. lipolytica* levou a um aumento da taxa específica de crescimento celular na fase exponencial (μ). A conseqüência direta deste resultado é um menor tempo necessário para a duplicação da massa celular (t_d). Além disso, o aumento da agitação também proporcionou um crescimento celular mais rápido para esta levedura.

Tabela 5.1. Parâmetros de crescimento celular determinados para *Yarrowia lipolytica* cultivada em frascos de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultivo YPD* com perfluorodecalina. Dados obtidos de AMARAL, 2003.

	μ (h^{-1})	t_d (h)	- *dS/dt* ($mg\ mL^{-1}\ h^{-1}$)
160 rpm			
0% PFC	0,13 ± 0,01	5,40 ± 0,53	0,18 ± 0,04
10% PFC	0,16 ± 0,02	4,37 ± 0,48	0,17 ± 0,02
20% PFC	0,23 ± 0,01	3,08 ± 0,16	0,26 ± 0,01
250 rpm			
0% PFC	0,17 ± 0,01	4,00 ± 0,11	0,31 ± 0,01
10% PFC	0,25 ± 0,01	2,75 ± 0,07	0,34 ± 0,01
20% PFC	0,53 ± 0,01	1,31 ± 0,02	0,39 ± 0,02

±: desvio padrão (baseado em dois experimentos – duplicatas)

Em relação à taxa de consumo de glicose (-*dS/dt*), detecta-se (Tabela 5.1) um aumento deste parâmetro com a adição de PFC para os dois sistemas (160 rpm e 250 rpm). O aumento na taxa de consumo de glicose foi mais evidente quando se aumentou a velocidade de agitação do sistema. Estes resultados sugerem que a levedura foi capaz de utilizar o suprimento adicional de oxigênio, tanto pelo aumento da agitação como pela adição de PFC. Portanto, a glicose pode ser utilizada mais facilmente, pois o

oxigênio, aceptor final de elétrons da cadeia respiratória, tornou-se menos limitante no cultivo com o aumento da agitação e com a adição de PFC.

KAMZOLOVA *et al*. (2003) verificaram aumento no acúmulo de biomassa no cultivo de *Y. lipolytica* com o aumento da concentração de oxigênio dissolvido no meio. Portanto, é possível que o aumento do crescimento celular esteja relacionado com o aumento da taxa de transferência de oxigênio para o cultivo pela adição do PFC, já que muitos autores já confirmaram a influência desse carreador de oxigênio no aumento de k_La (coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio), conforme mencionado na revisão bibliográfica.

Um efeito inesperado da adição de PFC no cultivo de *Y. lipolytica* foi o "desaparecimento" das células do meio de cultivo. De fato, depois da inoculação, minutos após a agitação em *shaker*, a fase aquosa, de onde foram retiradas as amostras para análise, ficou límpida, sem a presença de células e o PFC, que é um líquido transparente, apresentou uma intensa turvação. Esse fenômeno foi observado no cultivo realizado sob agitação de 250 rpm com 20% (v/v) de PFC. Para os cultivos realizados a 250 rpm com 10% (v/v) de PFC e a 160 rpm com 20% (v/v) de PFC, esse efeito foi mais brando, havendo apenas uma diminuição da concentração de células no meio aquoso.

Alguns autores (ELIBOL, 1997) relataram essa observação experimental como uma maior fase *lag* quando o PFC era adicionado ao meio de cultivo. Entretanto, observações visuais, com os sistemas estáticos, revelaram a possível presença das leveduras na fase orgânica (PFC). Nas amostras retiradas da fase do PFC, foi possível observar em microscópio ótico a presença de células de *Y. lipolytica.* Uma explicação para esse comportamento poderia ser a maior avidez por oxigênio das células de *Y. lipolytica*, já que é uma levedura estritamente aeróbia, o que levaria a esses organismos tenderem a ficar no meio que apresenta maior concentração de oxigênio dissolvido, o PFC.

De forma a elucidar tal fenômeno, adiciou-se meios de cultivo com células de *Y. lipolytica* em tubos de ensaio contendo PFC, alguns sendo submetidos a uma intensa agitação (vórtex) e outros a uma leve agitação manual. Esse experimento foi realizado também com células de *Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura que não apresenta avidez por oxigênio, podendo mesmo ser cultivada na ausência deste substrato. Como pode ser observado na Figura 5.1, os tubos contendo células de *Y. lipolytica* apresentaram turvação na fase do PFC, enquanto que a fase aquosa ficou límpida, mesmo com agitação lenta do sistema (Figura 5.1 (D, E)). Entretanto, os tubos contendo células de *S. cerevisiae* o PFC não apresentou turvação e a fase aquosa permaneceu turva (Figura 5.1 (A, B)), independentemente da intensidade de agitação dos sistemas.

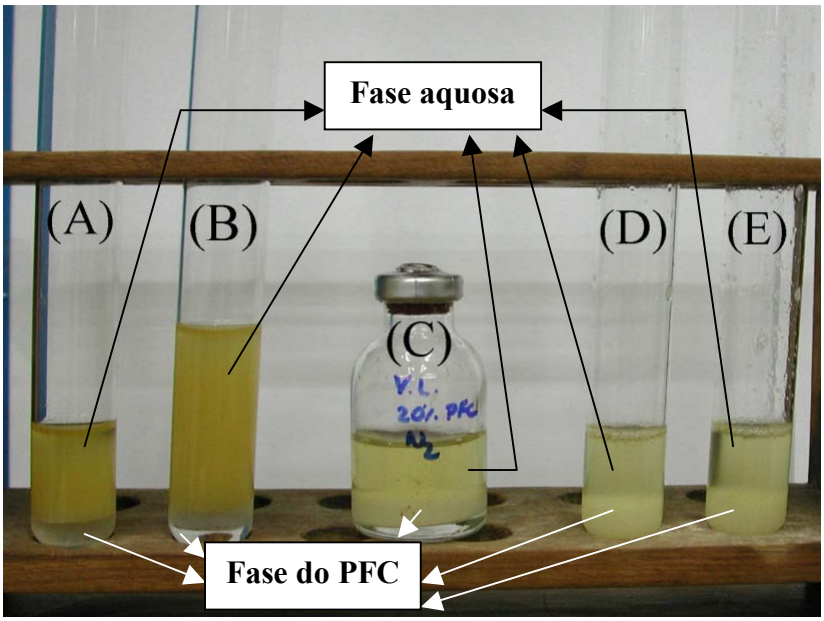

Figura 5.1. Foto dos tubos de ensaio contendo PFC e meio de cultivo com células. (A) Células de *Saccharomyces cerevisiae* submetidas à agitação intensa (vórtex); (B) Células de *Saccharomyces cerevisiae* submetidas à leve agitação manual; (C) Células de *Yarrowia lipolytica* submetidas à agitação intensa (vórtex) na ausência de oxigênio; (D) Células de *Yarrowia lipolytica* submetidas à agitação intensa (vórtex); (E) Células de *Yarrowia lipolytica* submetidas à leve agitação manual.

Tais observações suportam a hipótese da avidez por oxigênio das células de *Y. lipolytica* podendo ser o principal motivo de estas apresentarem maior afinidade com a fase do PFC. Com a finalidade de assegurar tal hipótese, um frasco contendo PFC e meio de cultivo com células de *Y. lipolytica* (Figura 5.1 (C)) foi lacrado e teve todo o conteúdo de oxigênio removido pelo borbulhamento de nitrogênio gasoso em seu interior através de uma agulha inserida pela tampa de borracha. É possível observar na Figura 5.1 (C) que, após agitação, o PFC também apresentou turvação neste caso, mostrando que mesmo na ausência de oxigênio, as células de *Y. lipolytica* também apresentam a tendência de passarem para a fase orgânica. Desta forma, uma nova hipótese deve ser proposta para explicar a presença das células no PFC.

No item 3.3.1 da revisão bibliográfica foram reportados os trabalhos que mostram a interação entre substratos orgânicos e células de *Y. lipolytica* e outras leveduras que também assimilam hidrocarbonetos. É possível que a parede celular de *Y. lipolytica* tenha tendência a interagir com o PFC. Portanto, tornou-se necessário um estudo das propriedades da parede celular da cepa de *Y. lipolytica* utilizada no presente trabalho, assim como das interações célula-PFC, para se elucidar a afinidade das células pela fase do PFC.

ROLS *et al*. (1990) estudando os mecanismos de transferência de massa em um sistema no qual se utilizou um carreador de oxigênio, o *n*-dodecano, para aumentar o suprimento deste gás no meio de cultivo de *Aerobacter aerogenes*, não detectou a presença de células nas gotas do hidrocarboneto. Portanto, o mecanismo de transferência de massa proposto por esses autores desconsidera a transferência de oxigênio do carreador diretamente para os microrganismos. Para o cultivo de *Y. lipolytica* na presença de PFC, é possível que o mecanismo de transferência de oxigênio seja diferente, o que reforça a necessidade de um estudo das interações entre as células e o PFC.

5.2. Presença de Células no PFC

Com o objetivo de se avaliar a quantidade de células presentes no PFC, após o cultivo das células de *Y. lipolytica* em meio YPD* na presença de 20% (v/v) de PFC por 170 horas, foi feita uma filtração das células presentes no PFC em filtro *Millipore* (0,45 μm) seguida de exposição a luz infravermelho (cerca de 10 minutos) até peso constante. Os resultados apresentados na Tabela 5.2 mostram que a quantidade de células no PFC aumentou com o aumento da agitação. Quando o sistema estava sob agitação de 160 rpm, o percentual de células no PFC no final dos experimentos foi de 29%, enquanto que quando o sistema foi agitado a 250 rpm, o percentual aumentou para 51%. Além disso, parece que o percentual de células no PFC também foi dependente da concentração de células na fase aquosa, quanto maior a concentração na fase aquosa, maior o percentual de células no PFC.

Tabela 5.2. Concentração de células de *Yarrowia lipolytica* na fase aquosa e na fase do PFC após o cultivo por 170 horas em frascos de 500 mL contendo 200 mL de meio YPD* sob agitação de 160 e 250 rpm com 20%(v/v) de PFC.

Agitação	Fase Aquosa ($mg\ mL^{-1}$)	Fase do PFC ($mg\ mL^{-1}$)
160 rpm	3,58 ± 0,09	1,44 ± 0,48
250 rpm	6,04 ± 0,14	6,33 ± 0,51

De forma a avaliar a influência da concentração de células da fase aquosa no percentual de células retidas no PFC, foram preparadas suspensões de células em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 com diferentes concentrações celulares. Frascos de 500 mL com 80 mL das suspensões e 20 mL de PFC forma submetidos à agitação de 250

rpm. Amostras da fase aquosa foram retiradas de tempos em tempos para medida de concentração de células na fase aquosa e a Tabela 5.3 apresenta o percentual de células na fase do PFC no equilíbrio, ou seja, quando a concentração de células na fase aquosa não variou mais (após 60 minutos de agitação).

Tabela 5.3. Percentual de células de *Yarrowia lipolytica*, suspensas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, que após agitação de 250 rpm, na presença de 20% (v/v) de PFC, se apresentam na fase do PFC.

[células][a] (mg mL^{-1})	%Células no PFC[b]
5,8	49,1
2,8	62,7
1,2	84,2
0,5	98,9

[a] Concentração de células na fase aquosa antes da adição de PFC.
[b] Concentração de células na fase aquosa no equilíbrio/[células]*100.

É possível observar na Tabela 5.3 que, ao contrário do que o resultado da Tabela 5.2 mostrou, o percentual de células no PFC é inversamente proporcional à concentração de células na fase aquosa. Isso mostra que, no caso do resultado anterior, o maior percentual de células no PFC foi devido apenas a maior agitação do sistema. Os resultados da Tabela 5.3 mostram que há um limite de solubilidade das células no PFC em uma determinada velocidade de agitação do sistema. Portanto, quanto maior a concentração de células presentes no cultivo, menor a subestimação da concentração celular dada pela medida de absorvância da fase aquosa.

5.3. O Efeito do PFC na Excreção da Lipase

Os cultivos realizados com objetivo de se estudar a influência do PFC na produção extracelular da lipase, nos quais se utilizou glicose como fonte de carbono, foram realizados até o início da fase estacionária de crescimento celular (aproximadamente 50 horas) com frascos de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultivo, agitados a 160 e a 250 rpm sem adição de PFC (controle) e com adição de 10 e 20% (v/v) desse carreador de oxigênio. Os perfis característicos obtidos para a atividade lipásica do sobrenadante (fase aquosa) estão apresentados na Figura 5.2 e na Figura 5.3.

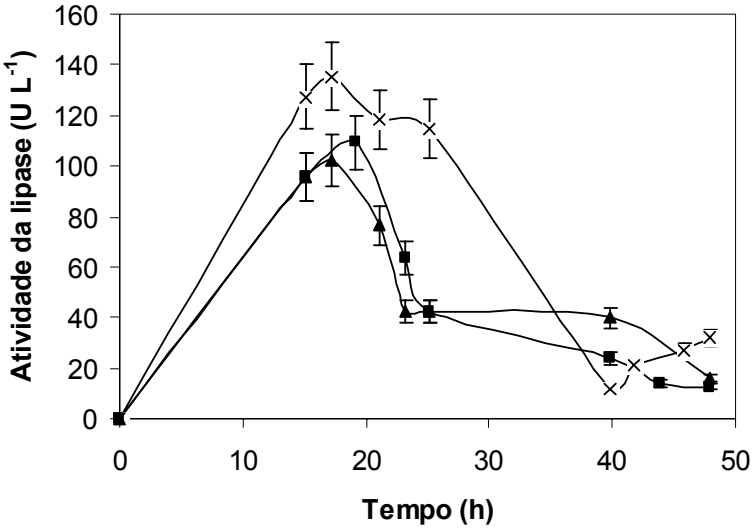

Figura 5.2. Atividade lipásica do sobrenadante do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em meio YPD* sob agitação de 160 rpm. (X) Controle (sem adição de PFC); (■) 10% (v/v) de PFC; (▲) 20% (v/v) de PFC. As linhas que ligam os pontos não correspondem ao perfil característico, são meramente para facilitar a visualização dos dados. Dados obtidos de AMARAL, 2003. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise.

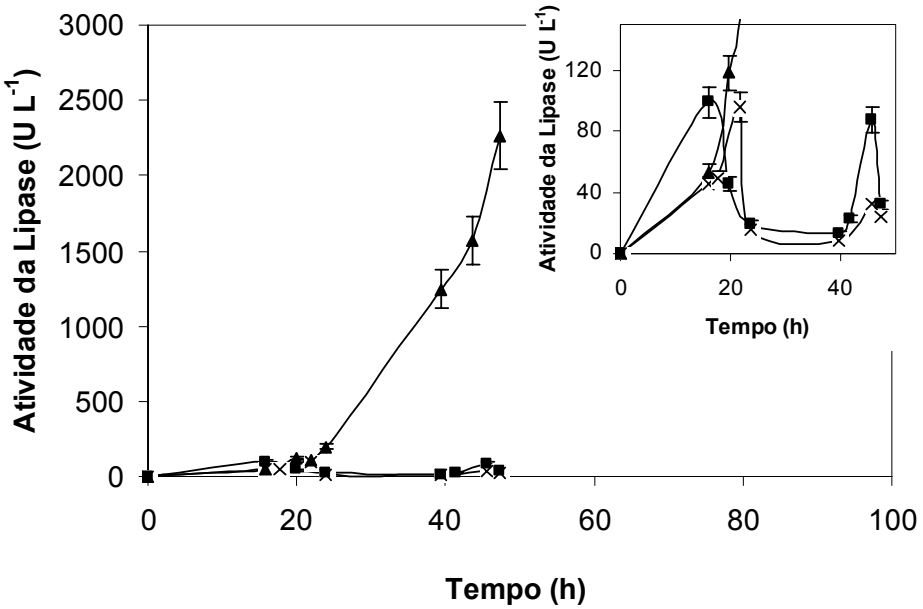

Figura 5.3. Atividade lipásica do sobrenadante do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em meio YPD* sob agitação de 250 rpm. (X) Controle (sem adição de PFC); (■) 10% (v/v) de PFC; (▲) 20% (v/v) de PFC. As linhas que ligam os pontos não correspondem ao perfil característico, são meramente para facilitar a visualização dos dados. Dados obtidos de AMARAL, 2003. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise.

A adição do PFC nos cultivos que foram realizados sob agitação de 160 rpm, não levou a um aumento da atividade da lipase na fase aquosa e, até pode-se dizer que houve uma queda na produtividade dessa enzima, como pode ser visto na Figura 5.2.

Os cultivos realizados sob agitação de 250 rpm apresentaram perfis diferentes daqueles obtidos quando o sistema foi agitado a 160 rpm, como pode ser observado na Figura 5.3 em comparação com a Figura anterior. A adição de 10% (v/v) de PFC também não provocou um aumentou no pico de atividade lipásica, como mostra mais claramente o gráfico superior à direita que amplia os dados através de uma escala menor. Entretanto, é possível notar um grande aumento na atividade da lipase com a adição de 20% de PFC no cultivo realizado a 250 rpm. Apesar do pico de atividade para esse cultivo ter sido obtido tardiamente em relação aos demais, o valor de atividade atingido (2260 U L^{-1}) foi consideravelmente maior e, portanto, a produtividade volumétrica da lipase nesse cultivo teve um aumento de 8 a 11 vezes (aproximadamente) em relação aos demais cultivos feitos a 250 rpm, como pode ser observado na Tabela 5.4. O valor de atividade máxima obtido significou também, nesse caso, maior produtividade volumétrica para esse cultivo (20% de PFC a 250 rpm) em relação aos cultivos realizados a 160 rpm (aumento de 6 a 8 vezes na produtividade volumétrica).

Tabela 5.4. Efeito do PFC na produtividade volumétrica da lipase dos cultivos de *Yarrowia lipolytica* em erlenmeyer de 500 mL com 200mL de meio YPD* sob agitação de 160 e 250 rpm. Dados obtidos de AMARAL, 2003.

	Produtividade Relativa (%)[a]		Produtividade Relativa (%)[a]
160 rpm		***250 rpm***	
0% PFC	100	0% PFC	100
10% PFC	78 ± 5	10% PFC	138 ± 6
20% PFC	79 ± 11	20% PFC	1121 ± 220

[a] Produtividade Relativa (Prod. Rel.) é a Produtividade volumétrica (U/L.h) $(Prod.)_i$ em relação a produtividade volumétrica do controle ($(Prod.)_{0\%PFC}$). (Prod. Rel.(%) = $(Prod.)_i$*100/$(Prod.)_{0\%PFC}$, onde i = 10%PFC ou 20%PFC). $(Prod.)_{0\%PFC}$ (160 rpm) = 8,4 U/(L.h); $(Prod.)_{0\%PFC}$ (250 rpm) = 4,7 U/(L.h).
±: desvio padrão (baseado em dois experimentos realizados nas mesmas condições).

É possível notar que o efeito do PFC foi significativo quando o sistema foi agitado a 250 rpm e com concentração de 20% (v/v) de PFC para a atividade da lipase, frente às demais condições estudadas.

ELIBOL (1999) estudou o efeito do aumento da velocidade de agitação, em um reator de 1 L, no valor do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) com a adição de PFC. Os resultados mostraram que a adição de perfluorodecalina (10 e

20%) causou um aumento neste parâmetro em todas as velocidades de agitação estudadas. No entanto, a partir de 400 rpm, a distância entre o valor de k_La do controle e dos sistemas com PFC aumentou bastante. É possível que em baixas velocidades de agitação ocorra a coalescência das gotas do carreador de oxigênio (ELIBOL, 1999), formando gotas maiores, diminuindo a superfície de contato do PFC com as bolhas de ar e com a fase aquosa, o que pode prejudicar a transferência de oxigênio. Portanto, dependendo do sistema utilizado (volume do reator, volume de meio líquido, aeração, etc), deve haver uma velocidade de agitação abaixo da qual o tamanho das gotas de PFC formadas não permite uma melhora na transferência de oxigênio.

5.4. O Efeito da Redução da Razão Volume de meio/Volume do frasco nos Cultivos com PFC

A partir dos resultados obtidos no item anterior aumentou-se o volume do frasco de *Erlenmeyers* de 500 mL para *Erlenmeyers* de 1 L. Como foi mencionado na revisão bibliográfica, a variação da razão volume de meio sobre o volume do frasco (*Vm/Vf*) altera sensivelmente a excreção de lipase de *Y. lipolytica*. PEREIRA-MEIRELLES (1997) detectou um aumento em mais de 50% na atividade máxima da lipase quando trabalhou com a razão de 0,2. Portanto, nessa etapa do trabalho, utilizou-se este valor, ou seja, 200 mL de meio em *Erlenmeyer* de 1 L. Os cultivos foram realizados sob agitação de 160 e 250 rpm e com adição de 20% (v/v) de PFC em comparação com o controle (sem PFC).

Os efeitos da diminuição da razão *Vm/Vf* na produção extracelular da lipase nos cultivos realizados na presença de 20% de PFC em comparação com o controle (sem PFC) sob agitação de 160 e 250 rpm, podem ser observados na Figura 5.4 e na Figura 5.5, respectivamente.

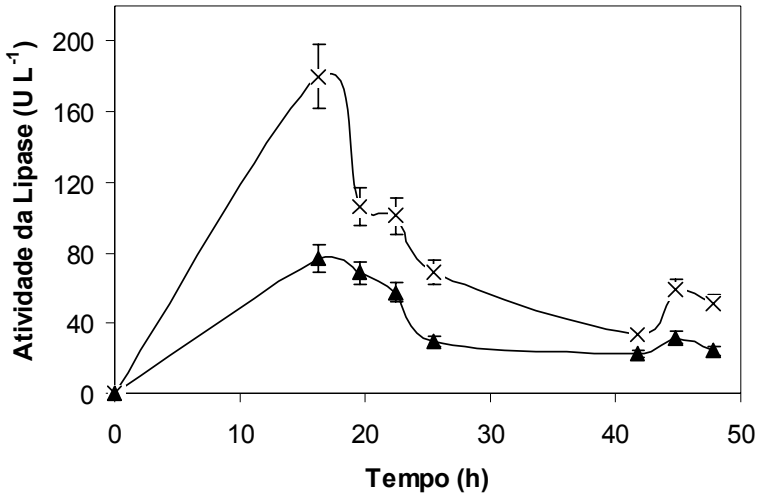

Figura 5.4. Atividade lipásica do sobrenadante do cultivo de *Y. lipolytica* em meio YPD* (200 mL em *Erlenmeyer* de 1L) sob agitação de 160 rpm. (X) Controle (sem adição de PFC); (▲) 20% (v/v) de PFC. As linhas que ligam os pontos não correspondem ao perfil característico, são meramente para facilitar a visualização dos dados. Dados obtidos de AMARAL, 2003. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise.

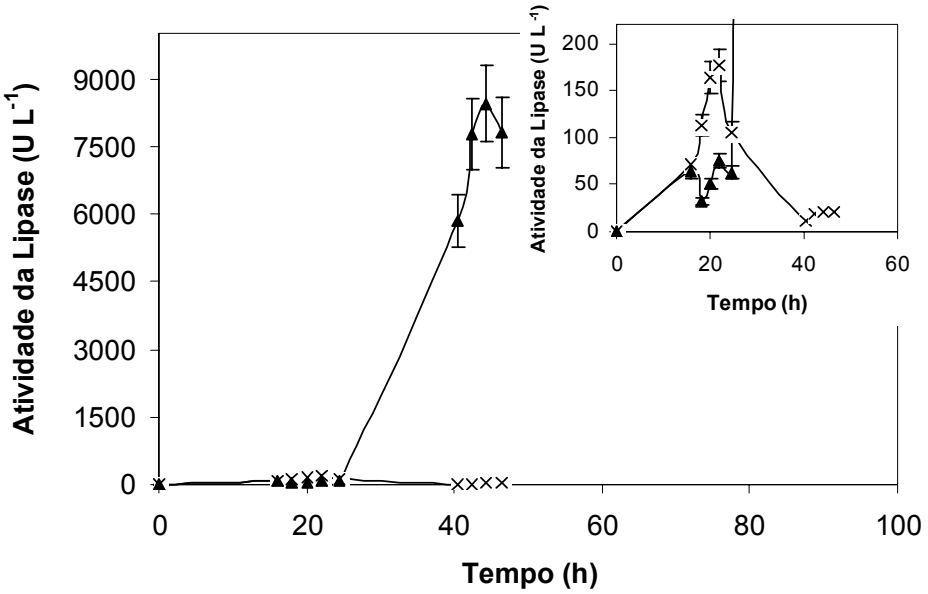

Figura 5.5. Atividade lipásica do sobrenadante do cultivo de *Y. lipolytica* em meio YPD* (200 mL em *Erlenmeyer* de 1L) sob agitação de 250 rpm. (X) Controle (sem adição de PFC); (▲) 20% (v/v) de PFC. As linhas que ligam os pontos não correspondem ao perfil característico, são meramente para facilitar a visualização dos dados. Dados obtidos de AMARAL, 2003. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise.

É possível perceber na Figura 5.4 que a redução da razão *Vm/Vf* não beneficiou a produção da lipase na presença de 20% de PFC sob velocidade de agitação de 160 rpm, em comparação com o seu respectivo controle.

Os perfis encontrados para a atividade da lipase nos experimentos realizados sob agitação de 250 rpm com *Vm/Vf* igual a 0,2 (Figura 5.5) foram bastante semelhantes àqueles obtidos nos experimentos realizados sob mesma agitação e com *Vm/Vf* igual a 0,4 (Figura 5.3), com o deslocamento do pico de atividade e o aumento no valor máximo de atividade na presença de 20% de PFC em comparação com o controle (sem adição de PFC). No entanto, é possível notar através dos valores apresentados na Tabela 5.5, que a adição de PFC nos experimentos realizados com menor razão *Vm/Vf* (0,2) provocou um aumento na produtividade volumétrica da lipase, quase 3 vezes maior que o aumento detectado com a razão *Vm/Vf* igual a 0,4. Comparando os dois experimentos controle (Figura 5.3 e Figura 5.5), também percebe-se um aumento no valor máximo de atividade (85%) e na produtividade volumétrica da lipase (83%).

Tabela 5.5. Comparação entre os valores de produtividade relativa da lipase obtidos nos cultivos de *Yarrowia lipolytica* sob agitação de 250 rpm em meio YPD* em *Erlenmeyers* de volumes diferentes (500 mL e 1 l) e mesmos volumes de meio (200 mL). Dados obtidos de AMARAL, 2003.

	Produtividade Relativa (%)[a]		Produtividade Relativa (%)[a]
Vf = 500 mL, Vm = 200 mL		***Vf = 1 L, Vm = 200 mL***	
0% PFC	100	0% PFC	100
20% PFC	1121 ± 220	20% PFC	3007 ± 630

[a] Produtividade Relativa (Prod. Rel.) é a Produtividade volumétrica (U/L.h) $(Prod.)_i$ em relação a produtividade volumétrica do controle ($(Prod.)_{0\%PFC}$). (Prod. Rel.(%) = $(Prod.)_i$*100/$(Prod.)_{0\%PFC}$, onde i = 10%PFC ou 20%PFC). $(Prod.)_{0\%PFC}$ (160 rpm) = 11,08 U/(L.h); $(Prod.)_{0\%PFC}$ (250 rpm) = 8,19 U/(L.h).
±: desvio padrão (baseado em dois experimentos realizados nas mesmas condições).

Os resultados sugerem que a diminuição da razão *Vm/Vf* provocou uma maior oxigenação da fase aquosa nos experimentos realizados sob agitação de 250 rpm devido a maior superfície de contato do meio líquido com o ar, o que aumentou o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) e, portanto, observou-se maiores valores de atividade lipásica. No entanto, a melhora no efeito do PFC com a redução de *Vm/Vf* não foi observada nos cultivos realizados sob agitação de 160 rpm, com relação à atividade lipásica.

Uma forma de quantificar tais suposições seria através da medida de k_La dos sistemas. Portanto, foi inserido um eletrodo de oxigênio (Lutron DO-5510, *Lutron Electronics Co., Inc*) no interior dos frascos, que era preso através de rolhas de algodão ao redor da parte superior do eletrodo na boca do frasco, para medida da concentração de oxigênio dissolvido. Os frascos continham meio de cultivo YPD*, na ausência e presença de 20% (v/v) de PFC, sem células, simulando os experimentos realizados para produção de lipase. Os sistemas foram previamente submetidos a desoxigenação com

fluxo de N_2 para posterior realização do método de medida de k_La descrito em Materiais e Métodos e os resultados são apresentados na Tabela 5.6 .

Tabela 5.6. Valores de obtidos em frascos de *Erlenmeyer* com meio YPD* e PFC agitados a 250 rpm com diferentes rações Vm/Vf (Volume de meio/Volume do frasco).

[PFC]	k_La (h^{-1})	
	***Vm/Vf* = 0,4**	***Vm/Vf* = 0,2**
0% PFC	1,7 ± 0,2	2,8 ± 0.3
20% PFC	4,3 ± 0,3	7,6 ± 0.3

±: desvio padrão (baseado em dois experimentos realizados nas mesmas condições).

É possível observar que há uma modificação do perfil de oxigenação nos sistemas pelo aumento de k_La com a redução de *Vm/Vf* e com a adição de 20% (v/v) de PFC. O resultado confirma que a presença de PFC nos sistemas aquosos aumenta a taxa de transferência de oxigênio. Portanto, o aumento da taxa específica de crescimento celular de *Y. lipolytica* e a maior produção de lipase podem ser atribuídos ao alívio da limitação de oxigênio.

Apesar dos resultados apresentados, as medidas de k_La adaptadas para os frascos agitados apresentam interferências como a instabilidade do eletrodo no interior do frasco e a redução da entrada de oxigênio devido à presença do eletrodo na boca do frasco. Tal fato evidencia a necessidade de realizar os cultivos em um biorreator, o que permite medidas mais corretas de k_La.

5.5. Efeito da Concentração de PFC na Produção de Lipase

Estudou-se o efeito da concentração de PFC presente no meio de cultivo na produção de lipase de *Y. lipolytica* em meio YPD* sob agitação de 250 rpm e *Vm/Vf* igual a 0,2. A Figura 5.6 apresenta os valores de atividade lipásica máxima obtidos para cada concentração de PFC, que variou de zero a 50% (v/v).

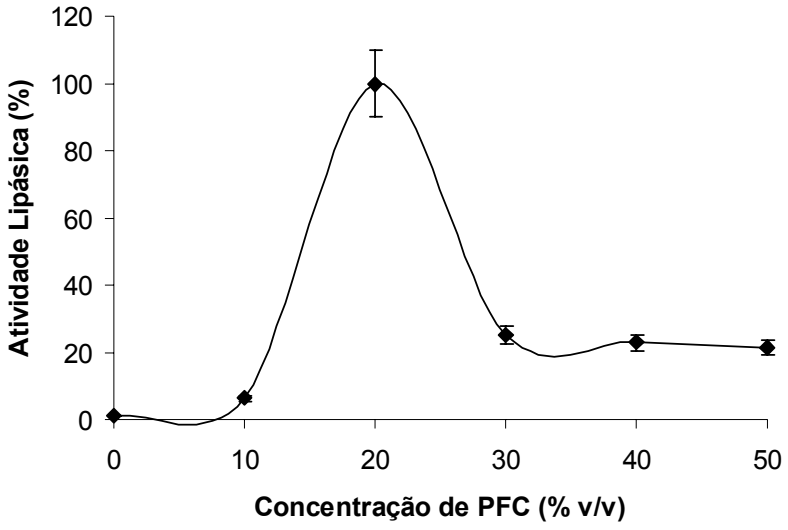

Figura 5.6. Influência da concentração de PFC na atividade lipásica do sobrenadante do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em meio YPD* (200 mL em erlenmeyer de 1L) sob agitação de 250 rpm. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise.

Ficou evidente que a concentração de PFC que promoveu maior atividade lipásica foi 20% (v/v). Esse resultado possivelmente se deve ao fato de que essa concentração maximiza a transferência de oxigênio do sistema. Alguns autores já mencionaram (CHO e WANG, 1988; ROLS *et al.*, 1990; ELIBOL e MAVITUNA, 1999) que o PFC beneficia a taxa de transferência de oxigênio até uma certa concentração, acima da qual ocorrem modificações no comportamento reológico do meio aumentando a viscosidade e, consequentemente, afetando a transferência de oxigênio. Muitos desses autores já mostraram a dependência do coeficiente de transferência de oxigênio (k_La) com a concentração de PFC em diferentes sistemas biológicos e todos apresentaram um máximo em, aproximadamente, 20% (v/v) de PFC.

5.6. Solubilidade da Lipase em PFC

Dada uma possível subestimação da produção da lipase durante o cultivo com PFC, já que na presença de 20% (v/v) de PFC o pico de atividade parece ser tardio em relação ao controle, foram feitos testes de solubilidade da lipase em perfluorodecalina.

Primeiramente, preparou-se uma suspensão com 0,10 mg mL^{-1} da lipase LipIMUFRJ em água destilada. Quinze mililitros dessa suspensão foram colocados para agitar (Controle 1) (agitação magnética) assim como 10 mL da suspensão com 5 mL de perfluorodecalina (Amostra 1). Após 24 horas de agitação, as varreduras de

comprimento de onda das amostras da fase aquosa de ambas as suspensões foram similares. Encontrou-se um pico em 261,8 nm para o Controle 1, com absorvância de 0,191 e para a Amostra 1 em 260,6 nm, com absorvância de 0,193. Fazendo-se a varredura da Amostra 1 contra o Controle 1 (branco), observaram-se valores de absorvância irrelevantes (dados não apresentados).

Aumentando-se a concentração da suspensão para 0,50 mg mL^{-1} detectaram-se picos próximos aos da Amostra 1 e do Controle 1, tanto para a suspensão submetida a agitação sem PFC (Controle 2), como para a Amostra 2, que foi submetida a agitação com PFC, como mostra a Figura 5.7. No entanto, os valores de absorvância foram mais elevados, 0,885 e 0,880, para o Controle 2 e para a Amostra 2, respectivamente. Observou-se também um pico em 215 nm, com um valor de absrovância de 2,362 para o Controle 2 e 2,375 para a Amostra 2. Novamente, fazendo a varredura da Amostra 2 contra o Controle 2 não se observou valores de absorvância significativos. Desta forma, podemos dizer que a lipase LipIMUFRJ não possui solubilidade em PFC.

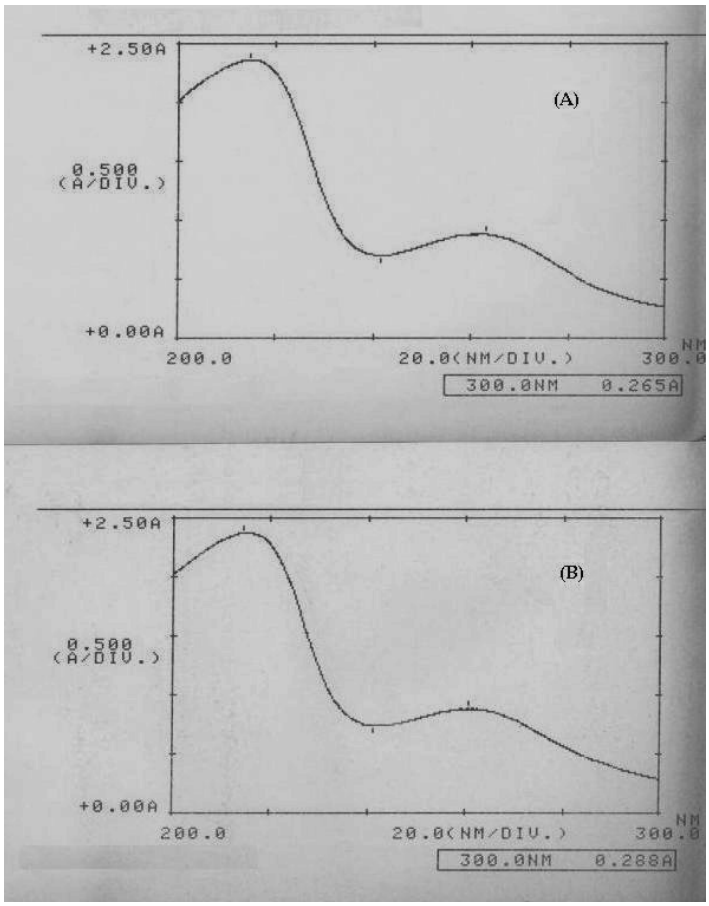

Figura 5.7. Varredura de comprimento de onda das amostras da suspensão com 0,50 mg mL^{-1} lipase LipIMUFRJ colocadas para agitar sem perfluorodecalina (Controle 2) (A) e com perfluorodecalina (Amostra 2) (B).

Com a finalidade de se certificar que a lipase não teria solubilidade em PFC, o mesmo procedimento foi realizado com uma lipase comercial (lipase de *Candida lipolytica*, *Fluka*, Germany). Com uma suspensão de 0,50 mg mL^{-1} não foi encontrado pico de absorvância nos comprimentos de onda estudados e os perfis do Controle 3 (suspensão de lipase agitada por 24 horas sem PFC) e da Amostra 3 (suspensão de lipase agitada por 24 horas com PFC) foram similares.

Portanto, preparou-se uma suspensão da lipase comercial com 6,00 mg mL^{-1} e o mesmo procedimento foi realizado. Observou-se um pico de absorvância em 203,0 nm com um valor de 1,488 para a suspensão de lipase submetida à agitação por 24 horas sem PFC (Controle 4). Para a Amostra 4 (suspensão de lipase submetida a agitação com PFC) o pico foi obtido em 203,4 nm, com um valor de 1,461. Os perfis detectados foram muito similares o que mostrou que a lipase comercial de *Candida lipolytica* (*Fluka*) não é solúvel em perfluorodecalina.

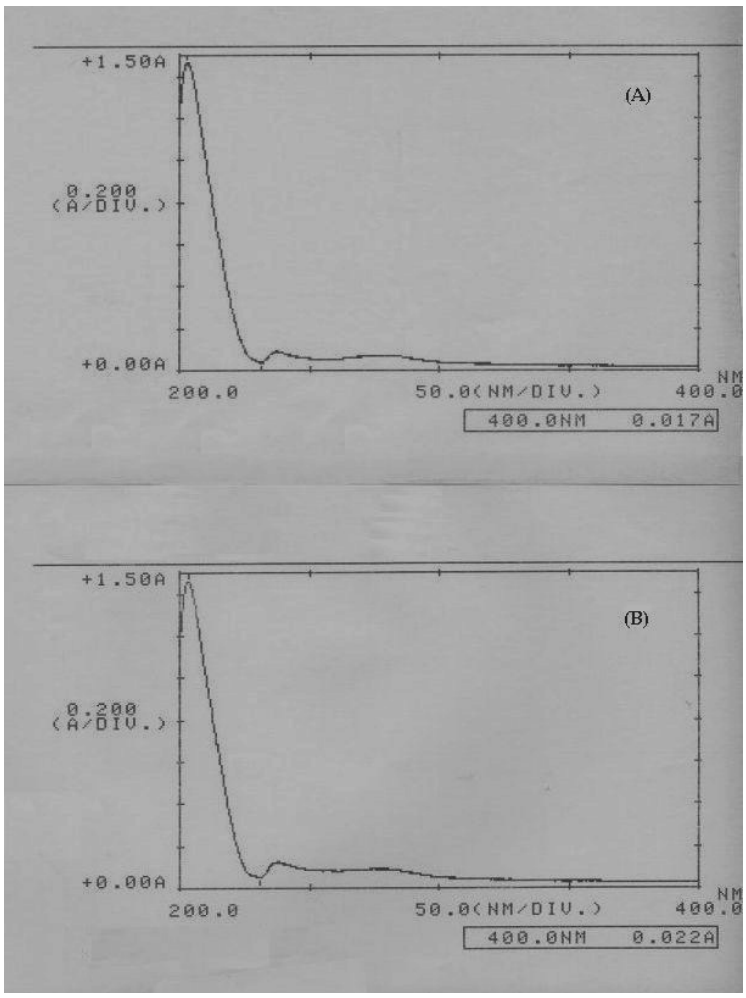

Figura 5.8. Varredura de comprimento de onda das amostras da suspensão com 6,00 mg mL^{-1} lipase comercial de *C. lipolytica* colocadas para agitar sem perfluorodecalina (Controle 4) (A) e com perfluorodecalina (Amostra 4) (B).

5.7. Características da Lipase obtida nos Experimentos com PFC

Os resultados obtidos até então para a produtividade da lipase extraída do meio de cultivo de *Y. lipolytica* na presença de PFC são bastante promissores. Entretanto, para que se confirme o efeito positivo do PFC é necessário analisar algumas características da enzima obtida. Foram realizados testes de estabilidade e atividade no extrato enzimático e os resultados estão apresentados nos próximos itens.

5.7.1. Perfis de Atividade Lipásica

A atividade lipásica extracelular foi acompanhada durante os cultivos através do método espectrofotométrico. Como foi mencionado na revisão bibliográfica, este método detecta além das lipases, outras esterases, o que pode superestimar os resultados no que se refere à enzima desejada, a lipase. Com a finalidade de se confirmar a presença da lipase nos cultivos com PFC, foram realizadas análises de atividade lipásica através de dois métodos, simultaneamente, o método espectrofotométrico e o método da titulação, que detecta enzimas que atuam sobre triacilgliceróis.

Os experimentos foram realizados em frascos de 1 L contendo 200 mL de meio de cultivo agitados a 250 rpm durante dez dias com amostragens diárias. Com o maior tempo de duração para esses experimentos foi possível observar se os picos de atividade detectados nos experimentos anteriores representavam os maiores valores de atividade ou se os verdadeiros máximos de atividade seriam detectados em tempos maiores. A Figura 5.9, Figura 5.10 e Figura 5.11 apresentam os perfis de atividade obtidos na determinação da atividade enzimática das amostras do meio de cultivo dos experimentos contendo 0, 10 e 20% (v/v) de PFC, respectivamente, por ambos os métodos mencionados.

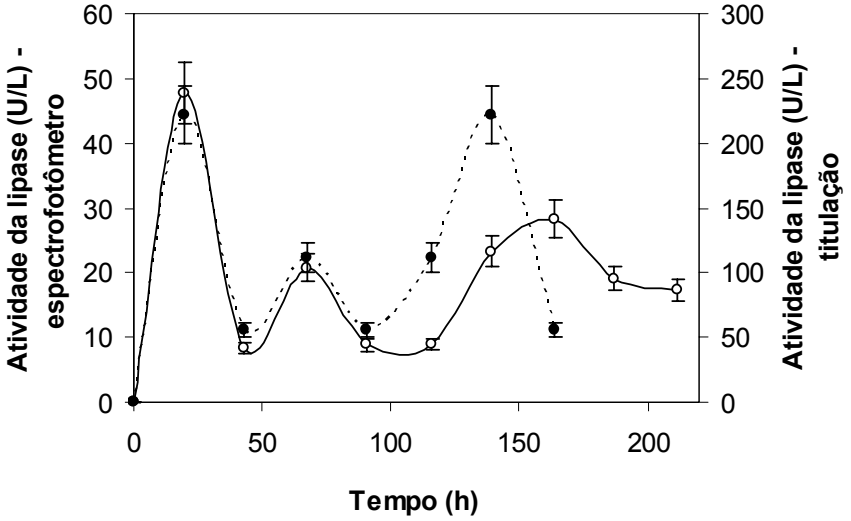

Figura 5.9. Atividade lipásica, medida pelo método espectrofotométrico (—○—) e pelo método da titulação (--●--), do sobrenadante do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em meio YPD* (200 mL em erlenmeyer de 1 L) sob agitação de 250 rpm com 0% (v/v) de PFC (controle). As linhas que ligam os pontos não correspondem ao perfil característico, são meramente para facilitar a visualização dos dados. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise.

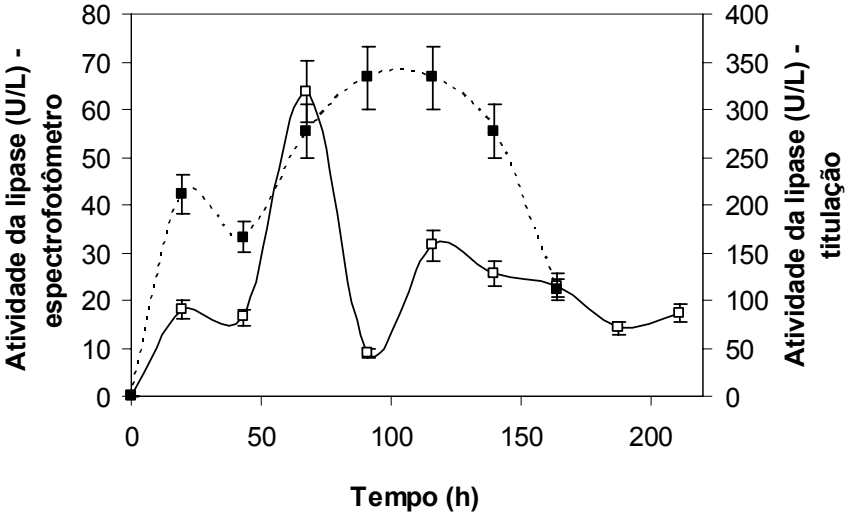

Figura 5.10. Atividade lipásica, medida pelo método espectrofotométrico (—□—) e pelo método da titulação (--■--), do sobrenadante do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em meio YPD* (200 mL em erlenmeyer de 1L) sob agitação de 250 rpm com 10% (v/v) de PFC. As linhas que ligam os pontos não correspondem ao perfil característico, são meramente para facilitar a visualização dos dados. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise.

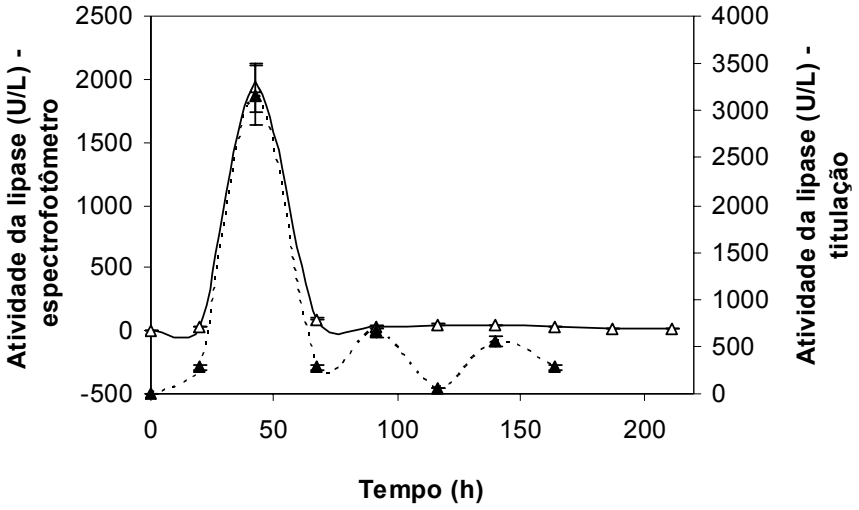

Figura 5.11. Atividade lipásica, medida pelo método espectrofotométrico (—Δ—) e pelo método da titulação (--▲--), do sobrenadante do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em meio YPD* (200 mL em erlenmeyer de 1L) sob agitação de 250 rpm com 20% (v/v) de PFC. As linhas que ligam os pontos não correspondem ao perfil característico, são meramente para facilitar a visualização dos dados. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise.

Analisando a Figura 5.9 é possível observar que para o experimento controle, o pico de atividade, obtido em torno de 20 horas de cultivo, que já havia sido detectado nos experimentos realizados com menor duração (Figura 5.4), foi confirmado pelo método titulométrico, o que mostra a presença de lipases. Com a maior duração deste experimento, foi possível detectar outros dois picos de atividade (em torno de 70 e 150 horas), mas com valores inferiores ao primeiro para os dois métodos.

Em relação ao experimento realizado com 10% (v/v) de PFC, um segundo pico de atividade, com valor maior que o primeiro foi observado utilizando as duas metodologias de dosagem. No entanto, como este segundo pico foi obtido tardiamente em relação ao primeiro (para as duas metodologias empregadas), a produtividade da lipase foi inferior àquela obtida com o primeiro pico, como pode ser observado na Tabela 5.7.

O aumento de produtividade da lipase com a adição de 20% (v/v) de PFC em comparação com o experimento controle foi confirmado pelo método da titulação, como pode ser observado na Figura 5.11. O perfil de atividade apresenta o máximo detectado pelos dois métodos ao mesmo tempo (43 horas de cultivo) com os valores de atividade lipásica (1940 U/L, espectrofotômetro; 3167 U/L, titulação) bem maiores que os obtidos no experimento controle (48 U/L, espectrofotômetro; 222 U/L, titulação), o que confirmou a presença de lipase e maior produtividade dessa enzima, como pode ser observado na Tabela 5.7.

Portanto, devido à semelhança nos perfis obtidos para a atividade enzimática por ambos os métodos, pode-se dizer que as enzimas presentes no meio de cultivo dos experimentos realizados com e sem PFC são lipases e que o método espectrofotométrico pode ser utilizado com confiança nesses casos.

Tabela 5.7. Efeito do PFC na produtividade volumétrica da lipase, medida através dos métodos do espectrofotômetro e titulação, dos cultivos de *Y. lipolytica* em frasco de 1 L com 200 mL de meio YPD* sob agitação de 250 rpm.

		Produtividade Volumétrica (U/L.h)	
		Método Espectrofotométrico	**Método Titulométrico**
0% PFC	1º Pico	2,39 ± 0,28	11,11 ± 1,11
10% PFC	1º Pico	0,96 ± 0,11	10,50 ± 1,06
	2º Pico	0,94 ± 0,11	4,09 ± 0,41
20% PFC	1º Pico	45,10 ± 5,41	73,64 ± 7,36

±: desvio padrão (baseado em dois experimentos – duplicatas).

Adicionalmente, a medida de atividade lipásica pelo método titulométrico permitiu uma melhor comparação com os dados da literatura. PEREIRA-MEIRELLES *et al*. (1997) estudaram a produção de lipase por *Y. lipolytica* em frascos agitados com óleo de oliva como fonte de carbono e obtiveram 2500 U L^{-1} de atividade da lipase medida pelo método titulométrico. Comparando com o resultado da Figura 5.9, valores inferiores de atividade lipásica medida pelo método titulométrico foram obtidos no presente trabalho, utilizando glicose como fonte de carbono, obtendo-se atividade lipásica máxima de 270 U L^{-1}. No entanto, PEREIRA-MEIRELLES *et al*. (1997) obtiveram o pico de atividade em 150 horas, não sendo a produtividade obtida no presente trabalho significativamente distinta daquela obtida pelos referidos autores. Com a adição de 20% (v/v) de PFC (Figura 5.11), foi possível obter valores superiores de atividade lipásica, assim como de produtividade, em comparação com a literatura (PEREIRA-MEIRELLES *et al*., 1997).

Em comparação com DOMINGUEZ *et al*. (2003), que trabalharam com misturas de triglicerídeos e glicose, a produção de lipase por *Y. lipolytica* em frascos agitados foi superior ao encontrado no presente trabalho. Mesmo que os picos de atividade tenham sido obtidos tardiamente (190 horas) em comparação com o estudo atual, os valores foram bastante superiores, como por exemplo, quando se utilizou glicose e óleo de girassol ou glicose e óleo de oliva, a atividade lipásica máxima foi de 58 000 U L^{-1} e 49 000 U L^{-1}, respectivamente. A grande diferença observada pode ser devido à indução da produção de lipase pela presença do triglicerídeo e/ou utilização de métodos de dosagem diferente. Os autores também utilizaram o método titulométrico,

no entanto utilizaram como substrato para a dosagem de lipase o óleo de oliva e a tritibutirina na concentração de 34,4 % (p/v), enquanto que o método utilizado no presente trabalho utiliza-se 20% (p/v) de óleo de oliva.

5.7.2. Estabilidade da Lipase

Para se estudar a estabilidade da lipase obtida com a adição de 20% (v/v) de PFC ao meio de cultivo de *Y. lipolytica*, o extrato enzimático foi mantido na temperatura de 28ºC (temperatura de experimento), na geladeira (4ºC) e no freezer (-4ºC). Os perfis de estabilidade para os extratos enzimáticos com e sem um inibidor de serina-protease, o PMSF (fluoreto de fenil metil sulfonil), mantidos na temperatura de experimento, na geladeira e no freezer são apresentados na Figura 5.12, na Figura 5.13 e na Figura 5.14, respectivamente.

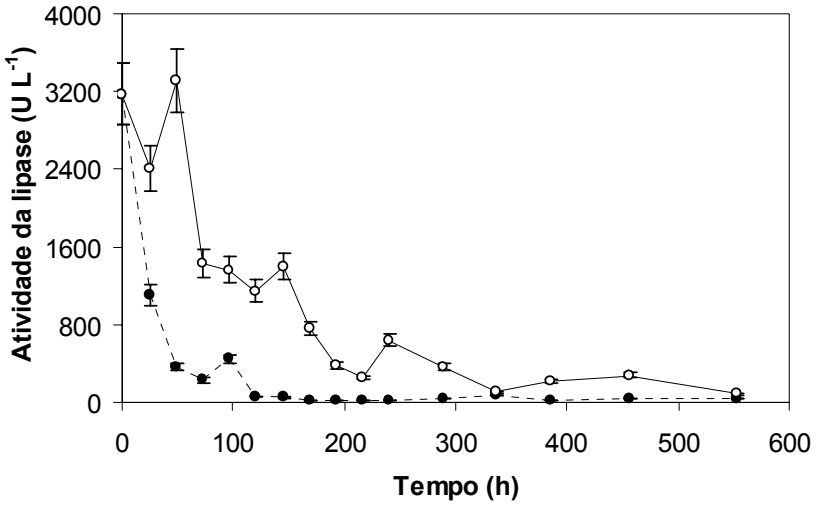

Figura 5.12. Perfis de estabilidade para a atividade lipásica dos extratos enzimáticos de lipase com (—○—) e sem (--●--) PMSF, mantidos na temperatura de 28º C. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise.

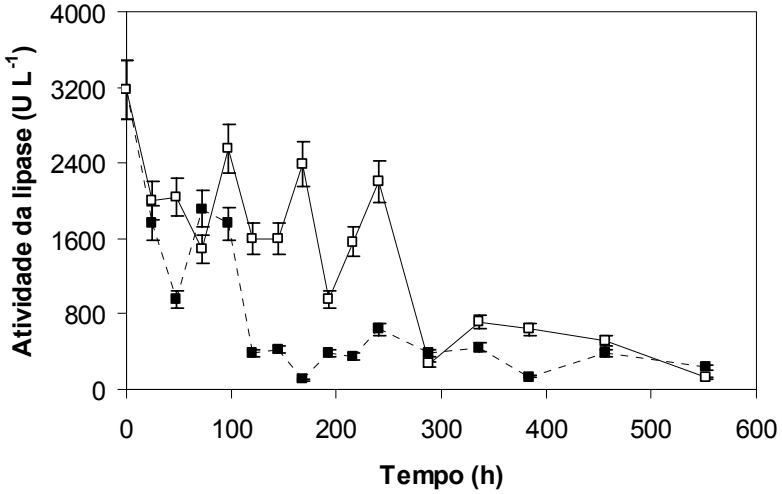

Figura 5.13. Perfis de estabilidade para a atividade lipásica dos extratos enzimáticos de lipase com (—□—) e sem (--■--) PMSF, mantidos a 4º C. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise.

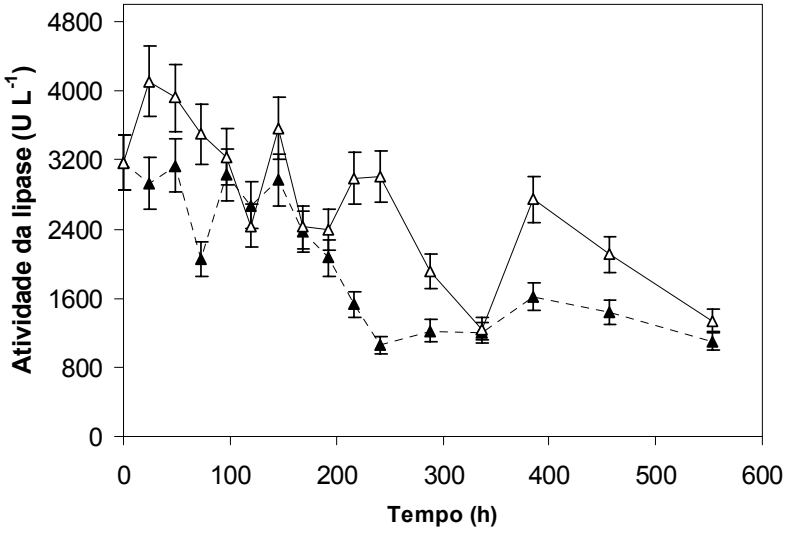

Figura 5.14. Perfis de estabilidade para a atividade lipásica dos extratos enzimáticos de lipase com (—△—) e sem (--▲--) PMSF, mantidos na temperatura de -4º C. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da análise.

Quando o extrato enzimático é mantido a 28º C sem PMSF, a atividade lipásica reduz-se cerca de 65% em 24 horas e cerca de 90% em 48 horas, enquanto que com o inibidor de protease, nesse mesmo período a atividade se mantém, praticamente, constante, como pode ser observado na Figura 5.12. Esse resultado é uma evidência de que a ação das proteases pode ser inibida com PMSF, permitindo manter uma razoável atividade lipásica (1400 U/L) por, aproximadamente, 6 dias na temperatura de 28º C.

Durante quatro dias, quando o extrato enzimático é mantido a 4º C, esta temperatura dimiuiu a ação das proteases e mantém a atividade lipásica dos extratos na presença ou na ausência de PMSF, como pode se verificar na Figura 5.13. No entanto, após 100 horas os perfis de atividade se diferenciam, mostrando que o PMSF passa a ter um papel importante para manter a atividade do extrato por mais 150 horas.

Verifica-se que os perfis de estabilidade da lipase dos extratos mantidos a - 4ºC (Figura 5.14), com e sem PMSF, são similares até aproximadamente 200 horas. Ao fim de 23 dias, os perfis de atividade ainda apresentavam valores bastante razoáveis (1000 – 1400 U/L). No entanto, após 65 dias de estocagem (dados não apresentados no gráfico) o extrato mantido a -4º C com PMSF ainda apresentava cerca de 50% da atividade lipásica original, enquanto que apenas 5% da atividade original foi detectada no extrato sem PMSF mantido na mesma temperatura.

Esses resultados demonstram que a temperatura de -4º C é ideal para se manter a atividade do extrato estudado e o PMSF deve ser adicionado para evitar a ação das proteases caso.

5.8. Conclusões Parciais do Capítulo 5

A adição de perfluorodecalina no meio de cultivo beneficiou a taxa específica de crescimento celular de *Y. lipolytica*, principalmente com o aumento da agitação do sistema.

As células de *Y. lipolytica* apresentaram uma alta afinidade pelo PFC, o que causou uma partição das células para a fase do PFC, sendo maior com o aumento da agitação do sistema. Parece haver um limite de partição das células na fase do PFC, o que permite a detecção das células na fase aquosa com o aumento da concentração celular no sistema.

A produção extracelular de lipase de *Y. lipolytica* na presença de glicose como fonte de carbono também foi beneficiada pela presença de PFC. A produtividade da lipase aumentou 11 vezes com a adição de 20% (v/v) de PFC quando o sistema foi agitado a 250 rpm com um valor de Vm/Vf de 0,4, em comparação com o controle (sem PFC). Esse efeito foi maior quando o valor de Vm/Vf foi reduzido para 0,2, com um aumento de 23 vezes na produtividade de lipase com a adição de 20% de PFC, em relação ao controle.

O liofilizado obtido do extrato enzimático produzido por *Y. lipolytica* na presença de PFC (LipIMUFRJ) não apresentou solubilidade em PFC pela metodologia

adotada. A lipase comercial de *Candida lipolytica* (*Fluka*) também não apresentou solubilidade em perfluorodecalina.

A enzima produzida por *Y. lipolytica* na ausência e presença de PFC foi confirmada como sendo uma lipase através do método titulométrico. A lipase produzida na presença de 20% (v/v) de PFC apresentou razoável estabilidade por 65 dias quando estocada a -4ºC na presença de PMSF, mantendo 50% da atividade original.

6. CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE CELULAR DE *Y. LIPOLYTICA*

Através dos resultados preliminares foi possível observar uma característica peculiar do microrganismo utilizado durante o cultivo na presença de PFC: a maior afinidade pela fase orgânica. De fato, a literatura reporta que microrganismos capazes de assimilar substratos hidrofóbicos, como é o caso da espécie *Y. lipolytica*, apresentam, em muitos casos, uma superfície celular diferenciada de forma a facilitar na assimilação de tais compostos.

Mesmo não sendo utilizada como um substrato, a perfluorodecalina se apresenta como uma fase orgânica no meio de cultivo e a forma como esta entra em contato com as células e a maneira como é dispersa no meio de cultivo influenciam na transferência de oxigênio do ar para a fase aquosa e para os microrganismos.

Quando ocorre adsorção direta entre a fase orgânica e as células, vários mecanismos podem estar envolvidos, incluindo interações hidrofóbicas ou eletrostáticas e alguns testes têm sido desenvolvidos para caracterizar as propriedades de superfície dos microrganismos (BELLON-FONTAINE *et al.,* 1996; MOZES e ROUXHET, 1987; ROSENBERG, 1981; VAN DER MEI *et al*., 1995).

Muitos dos ensaios para caracterizar a superfície celular são baseados na adesão celular à hidrocarbonetos (VAN DER MEI *et al*., 1995), à solventes (BELLON-FONTAINE *et al*., 1996) e à superfícies (ROSENBERG, 1981). Alguns autores (VAN DER MEI *et al*., 1998) alegam que estes testes evidenciam mais, um conjunto de fatores físico-químicos e estruturais envolvidos na adesão celular do que propriamente um único fator, isto é, a hidrofobicidade da superfície celular. A medida de ângulo de contato tem sido reconhecida como o padrão universal para determinação da hidrofobicidade da superfície microbiana (VAN DER MEI *et al*., 1998), especialmente se combinada a valores de ponto isoelétrico e medida de potencial zeta (RIJNAARTS *et al*., 1995a). No entanto, os testes de adesão celular também fornecem informações importantes relacionadas à superfície celular e sua interação com diferentes materiais, principalmente utilizando métodos que se complementam.

Portanto, de forma a elucidar os fenômenos relacionados com o contato das células de *Y. lipolytica* e a perfluorodecalina, através de uma caracterização da superfície celular, foram reunidas as informações obtidas por diferentes métodos e estas se apresentam nos itens a seguir.

6.1. Adesão de Células à Superfícies Sólidas

O estudo da adesão celular em superfícies sólidas é extremamente importante não apenas do ponto de vista de caracterização da superfície celular, mas ainda para muitos processos práticos e naturais como a filtração, o tratamento de águas, a imobilização de microrganismos, aplicações biomédicas, etc. Os resultados de adesão celular aqui apresentados se direcionam para a caracterização da superfície celular, mas podem servir como referência para outras aplicações.

Segundo a teoria clássica Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) da estabilidade coloidal, os mecanismos envolvidos no processo inicial de adesão celular são controlados por interações de *van der Waals* e eletrostáticas (HERMANSSON, 1999). Como a repulsão eletrostática é influenciada por propriedades eletrocinéticas tanto da superfície celular como da superfície sólida, a determinação das propriedades eletrocinéticas das duas superfícies é importante para a compreenção do fenômeno de adesão. Muitas superfícies sólidas e microbianas são carregadas negativamente em pH neutro e, conseqüentemente, as interações eletrostáticas são repulsivas. No entanto, interações, que não estão incluídas no modelo DLVO, influenciadas pela hidrofobicidade das células e dos sólidos podem contribuir para a adesão (RIJNAARTS *et al*., 1995a).

6.1.1. Adesão a Poliestireno e Vidro

O teste de adesão a poliestireno se baseia na suposição de que há uma relação entre a hidrofobicidade das células e sua adesão ao poliestireno, como posposto por ROSEMBERG (1981).

A caracterização das superfícies sólidas (poliestireno e vidro) foi realizada pela medida de ângulo de contato através da técnica da gota séssil. Os resultados para os ângulos de contato medidos nas superfícies com os líquidos empregados (água, diiodometano e formamida) estão listados na Tabela 6.1. Com estes dados foi possível obter os valores de tensão superficial e de energia livre de interação para as superfícies através das equações apresentadas no item 4.11.5, como mostra a Tabela 6.2.

Tabela 6.1. Medida do ângulo de contato para as superfícies sólidas: poliestireno e vidro.

Superfície	Água (º)	Diiodometano (º)	Formamida (º)
Poliestireno	90,5 ± 0,6	27,5 ± 0,8	73,5 ± 1,1
Vidro	16,6 ± 0,1	47,6 ± 0,3	51,8 ± 2,4

Tabela 6.2. Componentes da tensão superficial e energia livre das interações para as superfícies sólidas: poliestireno e vidro.

	Componentes de tensão superficial (mJ m^{-2})						
Superfície	γ^{LW}	γ^{+}	γ^{-}	γ^{AB}	γ^{TOT}	$\gamma_{sw}{}^{a}$	$\Delta G_{sws}{}^{b}$
Poliestireno	45,2	27,1	18,3	44,6	89,8	4,0	-7,9
Vidro	35,6	17,4	19,6	37,0	72,5	2,8	-5,6

[a] γ_{sw} – tensão interfacial entre a superfície sólida (s) e a água (w).
[b] ΔG_{sws} – energia livre das interações entre as moléculas da superfície sólida (s) imersas na água (w) calculados pela equação de Dupré (VAN OSS, 1995).

Os valores do ângulo de contato formados com a água podem fornecer informações preliminares sobre a hidrofobicidade da superfície sólida. Segundo a definição de RIJNAARTS *et al.* (1995a), o poliestireno apresenta um caráter hidrofóbico, pois o ângulo de contato entre a água e esta superfície é maior que 50º e o vidro apresenta um caráter hidrofílico, pois ângulo de contato entre a água e essa superfície é infrior a 20º. Segundo VAN OSS (1995), em geral, todas as superfícies ou compostos completamente hidrofóbicos apresentam um valor para a tensão interfacial com a água (γ_{sw}) maior ou igual a 45 mJ m^{-2}. Portanto, as superfícies utillizadas no teste de adesão, o poliestireno e o vidro, não são superfícies totalmente hidrofóbicas, até porque apresentam componentes de tensão superficial polar significativos. Segundo VAN OSS (1995) estas superfícies podem ser classificadas como parcialmente hidrofóbicas pois os valores para a energia livre de interação entre as moléculas da superfície imersas em água (ΔG_{sws}) estão entre -84 e 0 mJ m^{-2}. Portanto, pode-se considerar que as duas superfícies são parcialmente hidrofóbicas, sendo que o poliestireno tem um caráter mais hidrofóbico e o vidro um caráter mais hidrofílico.

A Figura 6.1 apresenta imagens das células de *Y. lipolytica* aderidas à superfície de poliestireno. É possível notar que a densidade das células aderida ao poliestireno é bastante alta em pH 7,0 e 9,0, diminuindo para uma adesão intermediária em pH 5,0 e baixa em pH 3,0.

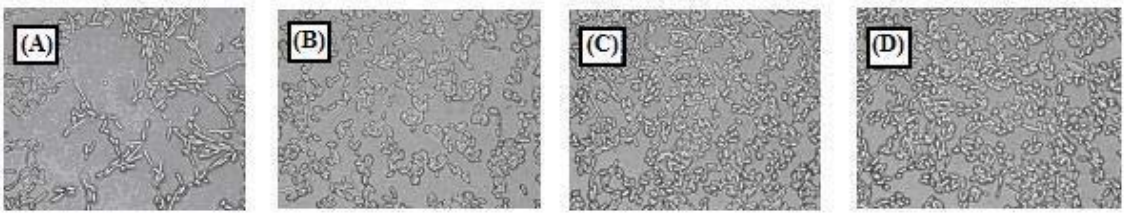

Figura 6.1. Imagens de microscopia ótica (1000 x) convertidas para escala de cinza de células de *Yarrowia lipolytica* aderidas em superfícies de poliestireno. As células foram suspensas em tampão fosfato 0,1 M, pH 3,0 (A); 5,0 (B); 7,0 (C); 9,0 (D).

Para efeito de comparação, o mesmo teste foi realizado com células de *S. cerevisiae*, como mostra a Figura 6.2. Esta espécie não assimila substratos hidrofóbicos e sua superfície tende a ser mais hidrofílica (MOZES e ROUXHET, 1987). É possível observar que para esta espécie, a adesão a poliestireno é baixa em todos os valores de pH estudados.

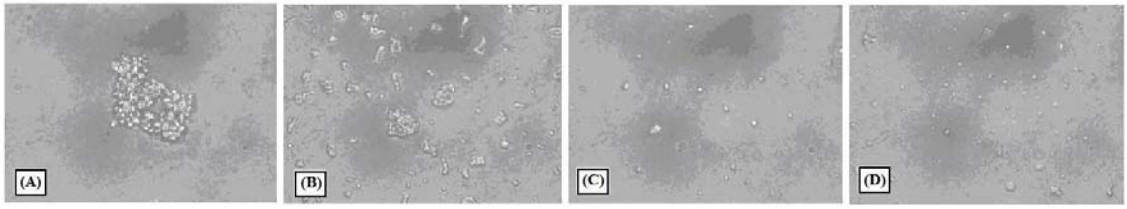

Figura 6.2. Imagens de microscopia ótica (1000 x) convertidas para escala de cinza de células de *Saccharomyces cerevisiae* aderidas em superfícies de poliestireno. As células foram suspensas em tampão fosfato 0,1 M, pH 3,0 (A); 5,0 (B); 7,0 (C); 9,0 (D).

Para se poder quantificar a adesão das células à superfícies foi utilizada a ferramenta do processamento digital de imagens (FREIRE *et al.*, 2005). O processamento das imagens dos testes de adesão às superfícies resultou em imagens como as apresentadas na Figura 6.3. Esse exemplo mostra a imagem obtida através do microscópio convertida em escala de cinza (Figura 6.3, A) e após o processamento da imagem em *Matlab® 6.1* (Figura 6.3, B). A partir dessa imagem, algumas informações podem ser obtidas, como a área coberta pelas células (em pixels). Portanto, é possível obter a razão entre a área ocupada pelas células e a área total (R_{ocup}), que é o parâmetro aqui utilizado para avaliar a adesão de células às superfícies. De forma a obter um resultado representativo, foram processadas e analisadas em torno de 12 imagens de cada superfície em cada condição testada (pH e força iônica).

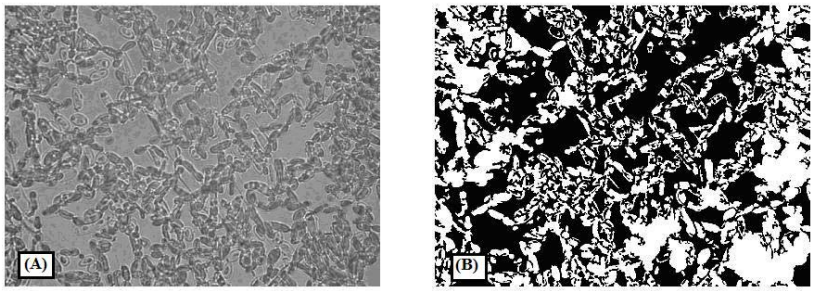

Figura 6.3. Exemplo das imagens obtidas pelo processamento de imagens: (A) imagem obtida através do microscópio convertida em escala de cinza; (B) imagem obtida após o processamento da imagem (A) em *Matlab® 6.1.*

A influencia do pH e da força iônica na adesão das células ao poliestireno, em termos de R_{ocup}, pode ser observada na Figura 6.4.

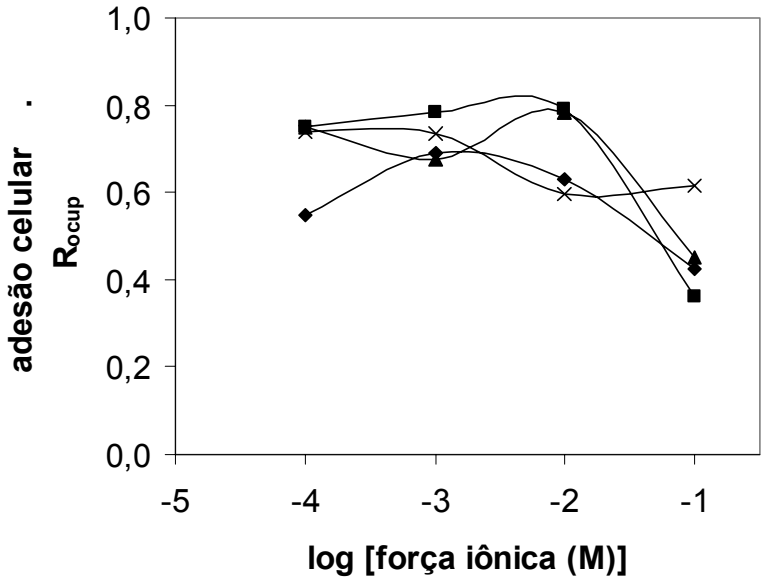

Figura 6.4. Adesão de *Yarrowia lipolytica* em poliestireno em pH 3 (♦), pH 5 (■), pH 7 (▲) and pH 9 (x) e força iônica variando de 10^{-4} M to 10^{-1} M. O desvio padrão variou de 2 a 10%.

É possível observar que a adesão das células a este material é relativamente alta para quase todas as condições estudadas, com mais de 50% da área da superfície coberta pelas mesmas. Apenas quando a força iônica é 0,1 M a adesão tende a diminuir. Quando as células foram suspensas em pH 9,0, a adesão ao poliestireno não variou signficativamente com a força iônica da solução.

RIJNAARTS *et al.* (1995a) mostraram que o ponto isoelétrico (PI) de um microrganismo é um parâmetro importante para prever as propriedades estéricas dos

polímeros da superfície celular e sua conseqüência para adesão. O PI de uma superfície celular é determinado pelo balanço entre as cargas dos grupos ácido/base aniônicos e catiônicos na superfície celular. Medidas de potencial zeta foram realizadas para suspensão celular de *Y. lipolytica* IMUFRJ, como mostra a Figura 6.5.

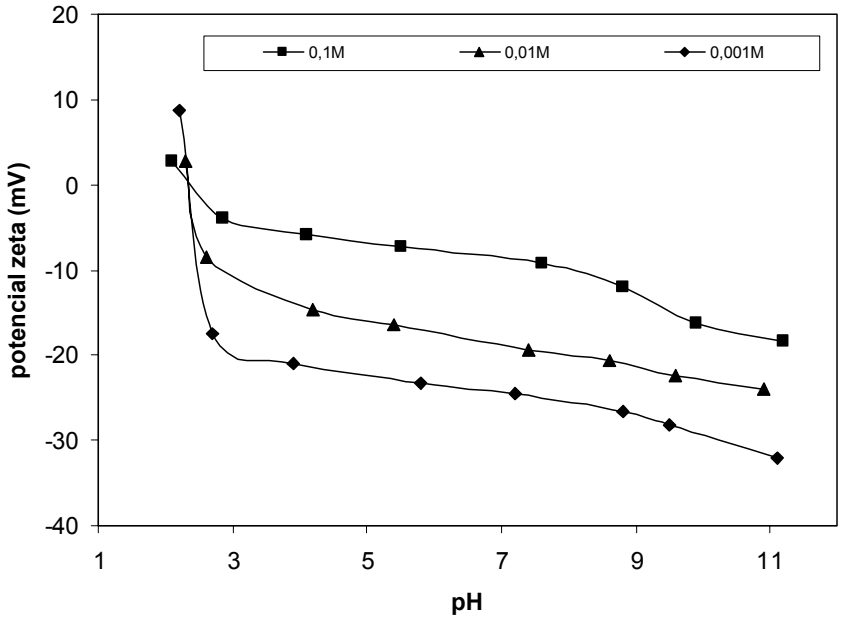

Figura 6.5. Influência do pH e da força iônica (KCl 0,1; 0,01 ou 0,001 M) no potencial zeta de uma suspensão celular de *Yarrowia lipolytica* cultivada por 48 horas em meio YPD sob agitação de 160 rpm.

A partir dos resultados da Figura 6.5, foi possível identificar o PI da superfície da levedura, que ficou em torno de 2,4. Portanto, a superfície celular é carregada negativamente quando em pH maior que 2,4. Além disso, é possível observar que para os valores de pH entre 3,0 e 7,0, existe uma pequena mudança na carga da superfície celular, apresentando um maior aumento em valores de pH acima de 7,0, quando a força iônica é mais alta (0,1 M). Para os demais valores de força iônica, há uma redução gradativa na carga da superfície com o aumento do pH desde o valor de pH 3,0. É possível notar que com a redução da força iônica do meio, a superfície das células apresenta uma carga mais negativa, entre pH 3,0 e 11,0.

Existe uma tendência de um aumento na adesão celular ao poliestireno com a redução da força iônica do meio até 0,001 M (Figura 6.4). Essa tendência pode ser devido ao aumento da carga negativa da célula com a redução da força iônica, como foi constatado pela medida de potencial zeta (Figura 6.5). Como a superfície de poliestireno utilizada apresentou um parâmetro doador de elétrons do componente polar de tensão

superficial (γ^+) relativamente alto (27,1), a adesão das células ao poliestireno parece ser parcialmente devido a interações eletrostáticas.

Quando o vidro foi utilizado como superfície de adesão, houve uma pequena redução da área ocupada pelas células, como pode ser visto na Figura 6.6, apresentando, porém, ainda valores elevados (em torno de 45%). Os perfis são similares aos obtidos com poliestireno (Figura 6.4), com a redução da adesão para força iônica mais alta.

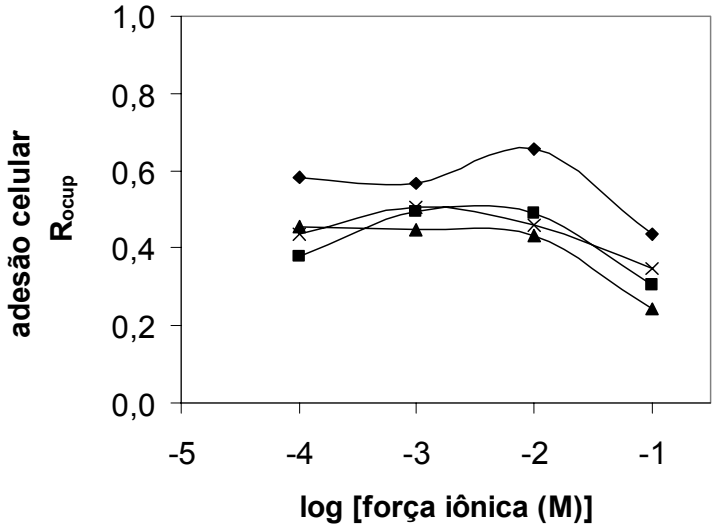

Figura 6.6. Adesão de *Yarrowia lipolytica* em vidro em pH 3 (♦), pH 5 (■), pH 7 (▲) and pH 9 (x) e força iônica variando de 10^{-4} M to 10^{-1} M. O desvio padrão variou de 2 a 11%.

Existe também uma tendência a aumentar a adesão ao vidro com a redução da força iônica do meio, só que um aumento menor. A diferença de adesão celular ao poliestireno e ao vidro pode ser devido a um menor valor para o parâmetro doador de elétrons do componente polar de tensão superficial (γ^+) do vidro (17,4) em comparação com o poliestireno (27,1). Além disso, como o vidro tem um caráter mais hidrofílico que o poliestireno (pelo ângulo de contato com a água), interações hidrofóbicas também podem influenciar na maior adesão das células ao poliestireno ou interações de *van der Waals*, dado o maior componente apolar da tensão superficial (γ^{LW}) para o poliestireno.

Segundo RIJNAARTS *et al.* (1995a) o PI em torno de 2,4 indica a presença de ácidos glucurônicos na parede celular ou de outros grupos carboxílicos associados a polissacarídeos. Esses polímeros podem inibir a adesão na presença de altas forças iônicas (0,1 M) devido a interações estéricas. De fato, esta redução de adesão quando se aumentou a força iônica foi observada para *Y. lipolytica* IMUFRJ, indicando a possível presença de tais polímeros na superfície dessa cepa.

Uma outra cepa de *Y. lipolytica*, *Y. lipolytica* W29, que é produtora de aromas (AGUEDO *et al*., 2003), foi utilizada nos mesmos testes de adesão de forma a comparar as características duas cepas da mesma espécie. A Tabela 6.3 apresenta os resultados para adesão das duas cepas de *Y. lipolytica* em poliestireno e vidro em diferentes valores de pH.

Tabela 6.3. Comparação entre a adesão de *Yarrowia lipolytica* W29 e *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ em poliestireno e vidro em força iônica de 10^{-1} M e pH 3, 5, 7 e 9.

pH	Adesão celular R_{ocup}			
	poliestireno		Vidro	
	W29	IMUFRJ	W29	IMUFRJ
3,0	0,28	0,43	0,24	0,44
5,0	0,18	0,36	0,22	0,31
7,0	0,22	0,45	0,12	0,24
9,0	0,20	0,61	0,12	0,35

É possível observar que a cepa *Y. lipolytica* W29 apresenta valores baixos de adesão, independente do material de adesão e do pH, quando comparado com a adesão de *Y. lipolytica* IMUFRJ.

Um perfil similar ao da Figura 6.5 para o potencial zeta em relação ao pH foi obtido por AGUEDO *et al.* (2005) para *Y. lipolytica* W29, em solução de KNO_3 0,001 M, com um PI em torno de 2,5. Nas mesmas condições as duas cepas apresentam uma carga de superfície similar (-20 mV) para valores de pH entre 4,0 e 8,0. Portanto, a adesão das células de *Y. lipolytica* IMUFRJ ao poliestireno e ao vidro não é devido apenas a interações eletrostáticas, pois embora as superfícies celulares apresentem cargas similares não aderem às superfícies sólidas com a mesma intensidade. Isso reforça a suposição de que interações apolares também podem estar influenciando na adesão das células de *Y. lipolytica* IMUFRJ ao poliestireno.

6.1.2. Adesão a Superfícies Modificadas

A adesão de *Y. lipolytica* em superfícies modificadas foi também testada de forma a observar o comportamento de adesão em superfícies com diferentes características, o que ajuda na caracterização da superfície da célula assim como abre caminhos para futuras aplicações.

Materiais de polímeros sintéticos, como o policarbonato, apresentam uma série de aplicações, como em reatores de leito fixo e na área biomédica. Para tal são necessárias modificações na interface polímero sintético/material biológico (LEHOCKY *et al.*, 2003).

No presente trabalho, utilizaram-se superfícies de policarbonato modificadas através da aplicação de descarga de barreira superficial em pressão atmosférica com nitrogênio misturado com hexametildisiloxano (HMDSO) ou octafluorociclobutano (C_4F_8) variando-se o fluxo de HMDSO ou de C_4F_8 e o tempo de deposição.

A Tabela 6.4 apresenta a tensão superficial e suas componentes das superfícies obtidas para as superfícies modificadas com HMDSO.

Tabela 6.4. Tensão superficial das superfícies modificadas pelo fluxo superficial de nitrogênio misturado com hexametildisiloxano (HMDSO). Valores obtidos pela medida de ângulo de contato realizadas no Departamento de Física Eletrônica, da Faculdade de Ciências da Universidade de Masaryk na República Checa pelo Dr. Pavel Stahel.

Amostra	Fluxo	Tempo	Componentes de tensão superficial (mJ m^{-2})						
	[g min^{-1}]	[s]	γ^{TOT}	γ^{LW}	γ^{AB}	γ^{+}	γ^{-}	γ_{sw} [b]	ΔG_{sws} [c]
$S_{(inicial)}$	0	0	45,8	42,9	2,90	0,70	3,30	30,78	-61,56
$S_{(a,30)}$	0,064	30	47,3	44,6	2,70	1,10	1,60	34,32	-68,64
$S_{(a,60)}$	0,064	60	27,6	26,0	1,60	0,50	1,20	34,53	-69,06
$S_{(a,90)}$	0,064	90	28,2	24,2	4,00	0,70	5,90	22,15	-44,29
$S_{(a,120)}$	0,064	120	28,6	26,4	2,20	0,70	1,70	31,78	-63,57
$S_{(b,30)}$	0,087	30	34,3	29,2	5,10	-	-	-	-
$S_{(b,60)}$	0,087	60	22,6	21,9	0,70	0,30	0,50	39,10	-78,20
$S_{(b,90)}$	0,087	90	34,9	30,5	4,40	2,30	2,10	26,17	-52,34
$S_{(b,120)}$	0,087	120	35,0	28,2	6,80	-	-	-	-
$S_{(c,30)}$	0,115	30	34,7	34,1	0,60	0,02	4,60	29,89	-59,77
$S_{(c,60)}$	0,115	60	32,6	32,2	0,40	-	-	-	-
$S_{(c,90)}$	0,115	90	31,3	31,3	0,02	0	0,01	50,85	-101,69
$S_{(c,120)}$	0,115	120	32,2	30,1	2,10	0,40	2,50	31,31	-62,62
$S_{(d,30)}$	0,170	30	27,0	26,6	0,40	0,50	0,07	41,80	-83,60
$S_{(d,60)}$	0,170	60	31,4	26,8	4,60	0,95	5,70	21,96	-43,92
$S_{(d,90)}$	0,170	90	27,8	27,7	0,11	0,05	0,06	46,73	-93,46
$S_{(d,120)}$	0,170	120	30,8	29,1	1,70	0,20	3,40	30,03	-60,07

[a]Tempo de deposição do fluxo de octafluorociclobutano.
[b]γ_{sw} – tensão interfacial entre a superfície sólida (s) e a água (w).
[c]ΔG_{sws} – energia livre das interações entre as moléculas da superfície sólida (s) imersas na água (w) calculados pela equação de Dupré (VAN OSS, 1995).

Em comparação com a superfície de policarbonato não-modificada, houve uma redução significativa na energia total da superfície para o fluxo de 0,064 g min^{-1} com o aumento do tempo de deposição, de aproximadamente 47 mJ m^{-2} para 29 mJ m^{-2}. Para maiores fluxos, o valor em torno de 30 mJ m^{-2} indica a criação de multicamadas.

Segundo VAN OSS (1995) uma superfíce é considerada como compeltamente hidrofóbica quando a tensão interfacial da superfície com a água (γ_{sw}) é maior que 45 mJ m^{-2} ou quando a energia livre de interação entre as moléculas da superfície imersas em água (ΔG_{sws}) é menor que -84 mJ m^{-2}. Pode-se classificar como parcialmente hidrofóbica a superfície que apresentar valores de ΔG_{sws} entre -84 e 0 mJ m^{-2}. Observando os parâmetros γ_{sw} e ΔG_{sws} das superfíceis tratadas com HMDSO (Tabela 6.4), verifica-se um aumento da hidrofobicidade da superfície, segundo a definição de VAN OSS (1995), para os menores fluxos (0,064 e 0,087 g min^{-1}) nos menores tempos de deposição, seguida de uma redução da hidrofobicidade com maiores tempos de deposição. Para os maiores fluxos de HMDSO (0,115 e 0,170 g min^{-1}) obtêm-se superfícies completamente hidrofóbicas com o tempo de deposição de 90 minutos.

Um mecanismo eletrocinético que está envolvido na adesão de células à superfícies é baseado no comportamento de bloqueio das células. Existem, em geral, duas possibilidades: ou as células apresentam um comportamento de bloqueio forte ou as células apresentam um bloqueio fraco e formam multicamadas (RIJNAARTS *et al.*, 1996). Esse fenômeno parece ter um papel muito importante nos sistemas celulares e explicam os diferentes comportamentos de adesão nas superfícies estudadas. As diferenças são ilustradas na Figura 6.7 para células de *S. cerevisiae* e *Y. lipolytica* depositadas na superfície de policarbonato submetida ao fluxo de 0,064 g min^{-1} de HMDSO por 30 minutos. Células de *S. cerevisiae* formam agregados locais em multicamadas, enquanto que as células de *Y. lipolytica* formam uma monocamada de células espalhadas randomicamente.

Os resultados da análise de imagens das células de *Y. lipolytica* aderidas às diferentes superfícies estão apresentados na Figura 6.8 . O tempo de deposição e o fluxo de HMDSO parecem ter pouca influência na adesão das células a essas superfícies. No entanto, as células nunca excedem a formação de monocamada, indicando que as células de *Y. lipolytica* apresentam um forte bloqueio quando depositadas sobre tais superfícies.

Por outro lado, os resultados de adesão de células de *S. cerevisiae* mostram que as mesmas apresentam um bloqueio fraco. A razão entre a área ocupada pelas células e a área total de algumas superfícies foi: $S_{(a,30)} = 0,23$; $S_{(b,60)} = 0,11$; $S_{(c,90)} = 0,02$; $S_{(d,120)} = 0,00$. O resultado mostra que tanto o aumento do fluxo de HMDSO como do tempo de deposição reduzem a adesão dessas células.

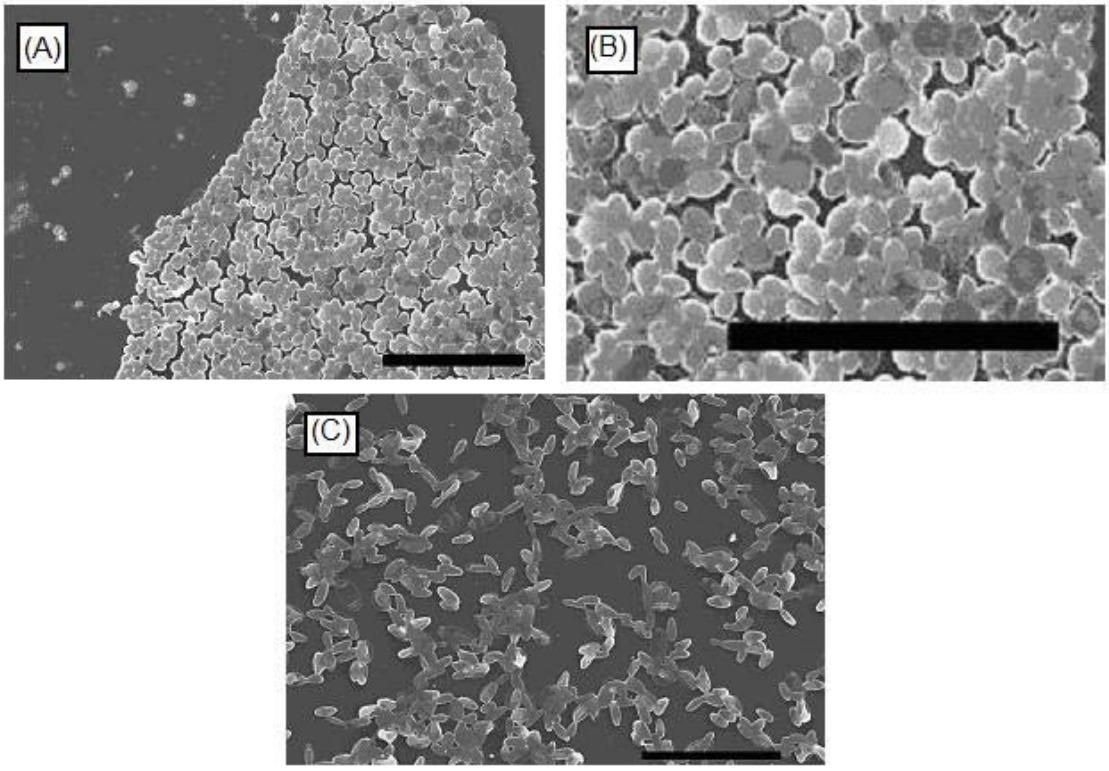

Figura 6.7. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para células de *Saccharomyces cerevisiae* (A e B) e *Yarrowia lipolytica* (C) depositadas em superfície de policarbonato modificada pelo fluxo de HMDSO de 0,064 g min^{-1} por 30 minutos. Barra de tamanho 30 μm.

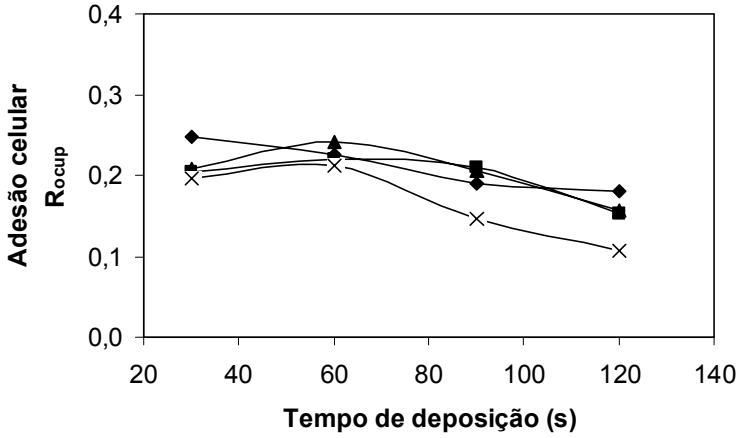

Figura 6.8. Adesão de células de *Yarrowia lipolytica,* suspensas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, em superfícies modificadas pelo fluxo de HMDSO com tempos de depoisção diferentes. Fluxo de HMDSO (em g min^{-1}): 0,064 (♦), 0,087 (■), 0,115 (▲) 0,170 (x). O desvio padrão variou de 3 a 10%.

Para as superfícies modificadas com o fluxo de C_4F_8, que gerou superfícies com um filme fino do tipo teflon (WANG *et al.*, 1977), a Tabela 6.5 apresenta as tensões superficiais e suas componentes.

Tabela 6.5. Tensão superficial das superfícies modificadas pelo fluxo superficial de nitrogênio misturado com octafluorociclobutano (C_4F_8). Valores obtidos pela medida de ângulo de contato realizadas no Departamento de Física Eletrônica, da Faculdade de Ciências da Universidade de Masaryk na República Checa pelo Dr. Pavel Stahel.

Amostra	Fluxo	Tempo[a]	Componentes de tensão superficial (mJ m^{-2})						
	[Lmin^{-1}]	[s]	γ^{TOT}	γ^{LW}	γ^{AB}	γ^{+}	γ^{-}	γ_{sw}[b]	ΔG_{sws}[c]
$S_{(0;0)}$	0	0	45,79	42,85	2,94	0,65	3,32	30,92	-61,83
$S_{(30;0.2)}$	0,2	30	30,95	20,80	10,15	6,76	3,81	15,19	-30,38
$S_{(60;0.2)}$	0,2	60	25,47	23,23	2,25	4,33	0,29	26,81	-53,62
$S_{(90;0.2)}$	0,2	90	22,17	21,05	1,12	4,34	0,07	28,40	-56,79
$S_{(120;0.2)}$	0,2	120	21,07	20,21	0,86	4,24	0,04	29,04	-58,07
$S_{(30;0.3)}$	0,3	30	32,79	23,52	9,28	1,33	16,18	8,04	-16,08
$S_{(60;0.3)}$	0,3	60	26,66	26,52	0,14	2,34	0,00	35,78	-71,56
$S_{(90;0.3)}$	0,3	90	22,07	20,50	1,58	6,24	0,10	24,18	-48,35
$S_{(120;0.3)}$	0,3	120	23,76	21,55	2,21	4,66	0,26	26,25	-52,50
$S_{(30;0.4)}$	0,4	30	33,90	23,54	10,36	1,11	24,50	0,83	-1,66
$S_{(60;0.4)}$	0,4	60	22,95	21,74	1,21	5,99	0,06	25,01	-50,01
$S_{(90;0.4)}$	0,4	90	23,58	21,63	1,95	5,51	0,17	25,06	-50,13
$S_{(120;0.4)}$	0,4	120	23,09	21,64	1,45	3,74	0,14	29,14	-58,27
$S_{(30;0.6)}$	0,6	30	32,78	22,43	10,35	6,4	4,18	15,15	-30,30
$S_{(60;0.6)}$	0,6	60	27,54	22,73	4,81	9,33	0,62	17,02	-34,04
$S_{(90;0.6)}$	0,6	90	22,53	21,66	0,87	5,19	0,04	26,88	-53,77
$S_{(120;0.6)}$	0,6	120	23,09	21,29	1,82	0,21	2,94	30,63	-61,26

[a]Tempo de deposição do fluxo de octafluorociclobutano.
[b]γ_{sw} – tensão interfacial entre a superfície sólida (s) e a água (w).
[c]ΔG_{sws} – energia livre das interações entre as moléculas da superfície sólida (s) imersas na água (w) calculados pela equação de Dupré (VAN OSS, 1995).

Em comparação com a superfície original de policarbonato ($S_{(0;0)}$), para um fluxo de 0,2 L min^{-1} é possível observar uma redução significativa na energia total da superfície de, aproximadamente, 45 mJ m^2 para 21 mJ m^2 com o aumento do tempo de deposição. Para maiores fluxos o valor em torno de 23 mJ m^2, com maiores tempos de deposição, indica a formação de multicamadas. Observando os parâmetros γ_{sw} e ΔG_{sws} detecta-se uma redução na hidrofobicidade, segundo a definição de VAN OSS (1995), para todos os fluxos de octafluorociclobutano com tempo de deposição de 30 segundos. Aumentando-se o tempo de deposição, a superfície volta a se tornar mais hidrofóbica.

Os resultados da análise de imagens de *Y. lipolytica* nas superfícies modificadas estão resumidos na Tabela 6.6. Os resultados sugerem que o tempo de deposição e os fluxos utilizados para a preparação das camadas do tipo teflon têm um efeito negativo na adesão das células em relação ao policarbonato virgem. Foi possível observar que as células formaram uma monocamada, assim como para as superfícies submetidas a fluxos com HMDSO, e se espalharam randomicamente na superfície, o que demonstra que há um comportamento de forte bloqueio das células nessas superfícies.

Tabela 6.6. Adesão e destacamento de células de *Yarrowia lipolytica* suspensas em tampão fosfato 0,1 ou 0,01 M, pH 7,0, em superfícies modificadas pelo fluxo de C_4F_8 com tempos de deposição diferentes. O desvio padrão variou de 5 a 11%.

Amostra	Adesão		Destacamento	
	R_{ocup} (%) Tampão 0,1 M	R_{ocup} (%) Tampão 0,01 M	R_{ocup} (%) Tampão 0,1 M	R_{ocup} (%) Tampão 0,01 M
$S_{(0;0)}$	0,518	0,722	0,125	0,145
$S_{(30;0.2)}$	0,105	0,430	0,091	0,384
$S_{(30;0.3)}$	0,284	0,312	0,263	0,288
$S_{(30;0.4)}$	0,244	0,514	0,240	0,476
$S_{(30;0.6)}$	0,144	0,424	0,127	0,399
$S_{(60;0.2)}$	0,379	0,291	0,361	0,274
$S_{(60;0.3)}$	0,252	0,390	0,239	0,367
$S_{(60;0.4)}$	0,224	0,413	0,213	0,394
$S_{(60;0.6)}$	0,177	0,500	0,162	0,466
$S_{(90;0.2)}$	0,468	0,470	0,428	0,451
$S_{(90;0.3)}$	0,401	0,467	0,382	0,446
$S_{(90;0.4)}$	0,496	0,476	0,459	0,461
$S_{(90;0.6)}$	0,166	0,427	0,158	0,408
$S_{(120;0.2)}$	0,166	0,314	0,152	0,301
$S_{(120;0.3)}$	0,147	0,482	0,129	0,458
$S_{(120;0.4)}$	0,310	0,526	0,284	0,489
$S_{(120;0.6)}$	0,252	0,366	0,239	0,351

É possível observar na Tabela 6.6 que a adesão parece ser dependente da força iônica da suspensão celular. A razão entre a área ocupada pelas células e a área total (R_{ocup}) é, na maioria dos casos, maior para as células que foram suspensas em tampão

0,01 M do que em 0,1 M, o que já havia sido observado para as superfícies de poliestireno.

Para estas superfícies foi também estudado a dessorção das células previamente aderidas colocando-se cada amostra sob um fluxo laminar de água por 10 horas para simular as condições de fluxo encontradas em biorreatores de leito fixo. Esse teste foi realizado no Departamento de Física Eletrônica, da Faculdade de Ciências da Universidade de Masaryk na República Checa pelo Dr. Pavel Stahel. Em seguida, o procedimento de registro e análise das células foi realizado como descrito no item 4.11.2.4 para o teste de adesão.

O teste de dessorção das células foi realizado para avaliar a força da interação célula-superfície. Comparando os resultados de adesão e dessorção apresentados na Tabela 6.6, pode-se notar a vantagem das superfícies modificadas. Os valores de R_{ocup} para as superfícies não-tratadas reduziram-se drasticamente quando submetidas à tensão cisalhante induzida pelo fluxo laminar de água. Portanto, pode-se dizer que o tratamento das superfícies levou a uma maior interação das células de *Y. lipolytica* com as superfícies.

6.1.3. Cromatografia de Interação Hidrofóbica (CIH)

Este teste é baseado na adesão das células a um gel hidrofóbico, *phenyl sepharose*, na presença de alta força iônica (4 M) e baixa força iônica (0,1 M).

Para se investigar mudanças no comportamento da superfície das células do pré-inóculo e das células cultivadas por 170 horas em meio utilizado para a produção de lipases no presente trabalho, o teste foi realizado com amostras de ambas condições de cultivo.

Os percentuais de células retidas pelo gel cromatográfico, em função do pH, na presença de alta força iônica (R_{AFI}) e na presença de baixa força iônica (R_{BFI}) são apresentados na Figura 6.9. As células do pé-inóculo e àquelas cultivadas por 170 horas são todas retidas pelo gel cromatográfico na presença de alta força iônica (R_{AFI} = 100%) sem nenhuma dependência com o valor de pH. A retenção das células na presença de baixa força iônica também é bastante alta ambos os cultivos, sendo acima de 90% para as células do pré-inóculo e 100% para as células cultivadas por 170 horas.

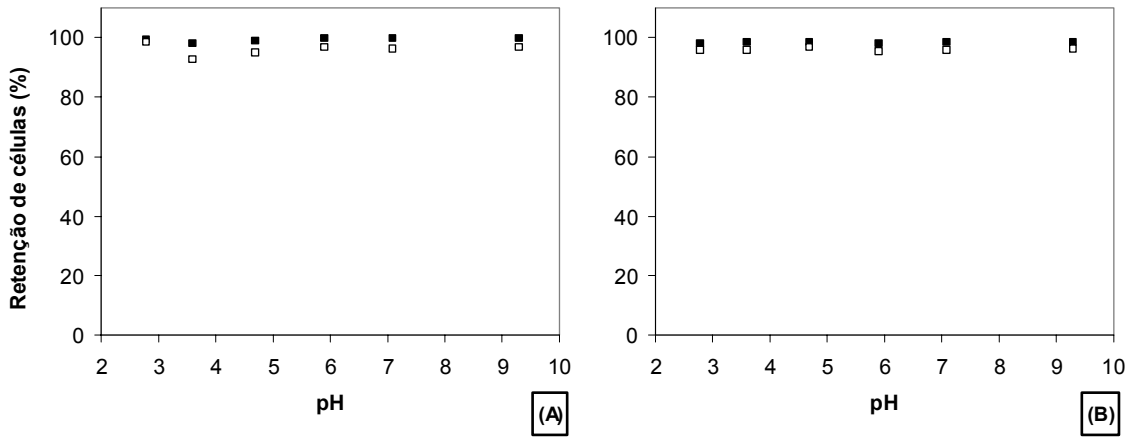

Figura 6.9. Retenção de células de *Yarrowia lipolytica* pelo gel cromatográfico na presença de alta força iônica, R_{AFI} (■) e na presença de baixa força iônica, R_{BFI} (□). (A) Células cultivadas por 48 horas em meio YPD. (B) Células cultivadas por 170 horas em meio YPD*. O desvio padrão foi menor que 4%.

Uma alta R_{ALF} já seria um indício de uma característica hidrofóbica da superfície celular. No entanto, segundo MOZES e ROUXHET (1987) esse parâmetro não permite mostrar diferenças entre microrganismos que apresentam propriedades de superfície distintas mostradas por outros métodos, ou seja, células com superfície hidrofílica ou hidrofóbica podem apresentar alta R_{AFI}. É um bom parâmetro apenas no caso de hidrofobicidade positiva. Isso pode acontecer, pois as moléculas de proteína desidratam na presença de alta força iônica através do efeito *salting-out* que reduz a hidrofilicidade, favorecendo sua adsorção em superfícies com baixa tensão superficial (VAN OSS, 1995). No entanto, em baixa força iônica e em valores de pH elevados essas proteínas recuperam sua superfície original e as repulsões eletrostáticas evitam a retenção das células pelo gel de *phenyl sepharose*, exceto no caso de microrganismos com superfície hidrofóbica.

Portanto, pelo teste de CIH, a superfície de *Y. lipolytica* é hidrofóbica, pois também apresenta alta retenção no gel hidrofóbico em baixa força iônica (Figura 6.9).

Para efeito de comparação o teste foi realizado com a cepa *Y. lipolytica* W29 e com células de *S. cerevisiae*, todas cultivados por 48 horas em meio YPD e o resultado pode ser visualizado na Figura 6.10.

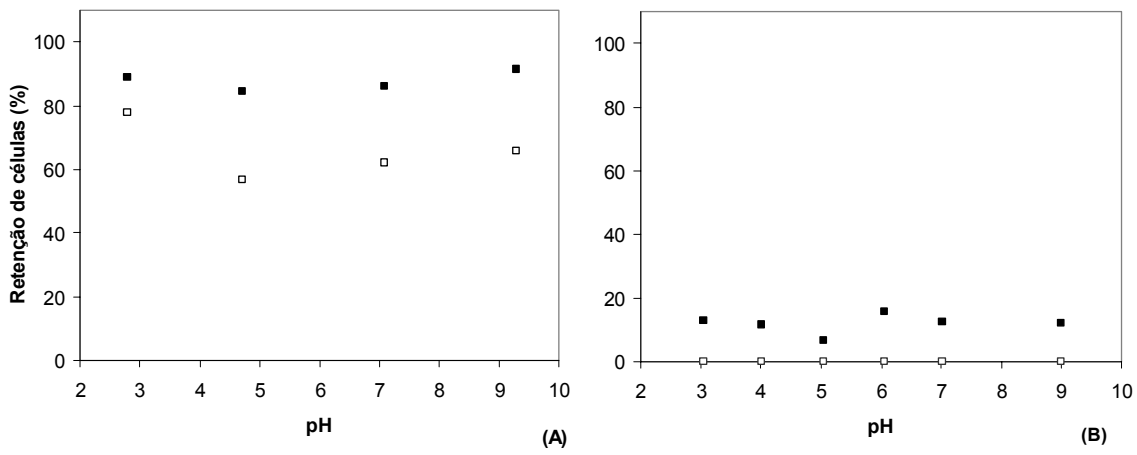

Figura 6.10. Retenção de células de *Yarrowia lipolytica* W29 (A) e *Saccharomyces cerevisiae* (B) pelo gel cromatográfico na presença de alta força iônica, R_{AFI} (■) e na presença de baixa força iônica, R_{BFI} (□). O desvio padrão foi menor que 5%.

É possível observar que para as células de *Y. lipolytica* W29, a R_{AFI} é menor do que para *Y. lipolytica* IMUFRJ, mas ainda alta, ficando em torno de 90% em todos os valores de pH testados. No entanto, na presença de baixa força iônica, que realmente caracteriza a hidrofobicidade da superfície celular, a retenção de células pelo gel cromatográfico reduz bastante, ficando em torno de 60% para pHs superiores a 4,0. Esse resultado confirma que há comportamentos distintos quando a força iônica é modificada e que na presença de baixa força iônica pode haver uma redução na retenção celular, indicando uma menor hidrofobicidade das células.

A Figura 6.10 (B) também mostra a retenção das células de *S. cerevisiae* ao gel hidrofóbico. Na presença de alta força iônica ou baixa, a retenção das células é quase desprezível, em relação à retenção das células de *Y. lipolytica* IMUFRJ, principalmente para R_{BFI}, indicando a hidrofilicidade da superfície das células de *S. cerevisiae*. Esse resultado mostra que o teste é confiável para se detectar superfícies celulares hidrofílicas, já que vários outros métodos já detectaram a alta hidrofilicidade da superfície celular dessa espécie (MOZES e ROUXHET, 1987).

Para se investigar a natureza das interações entre a superfície celular e o gel hidrofóbico, o teste de CIH foi realizado com as células de *Y. lipolytica* IMUFRJ depois de serem tratadas com pronase por 4 horas como descrito no item 4.11.7. A pronase é uma mistura de endo e exo-proteases que catalisam a clivagem de quase todas as ligações peptídicas. A Figura 6.11 apresenta os resultados.

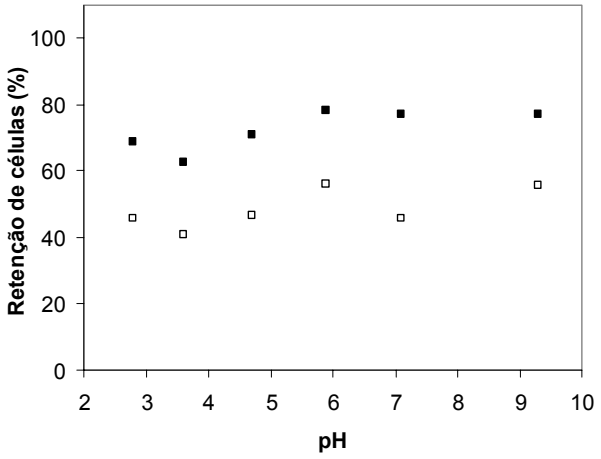

Figura 6.11. Retenção de células de *Yarrowia lipolytica* tratadas com pronase por 4 horas, pelo gel cromatográfico na presença de alta força iônica, R_{AFI} (■) e na presença de baixa força iônica, R_{BFI} (□).O desvio padrão foi menor que 4%

Mesmo na presença de alta força iônica, o que favorece a agregação de células, houve uma redução significativa da retenção celuar pelo gel hidrofóbico em comparação com àquela obtida antes do tratamento com pronase (Figura 6.9). Além disso, a Figura 6.11 mostra que na presença de baixa força iônica, apenas cerca de 50% das células ficaram retidas pelo gel, o que indica uma redução significativa das interações entre a superfície celular e a superfície hidrofóbica. Esse resultado sugere que as características da superfície celular resultam de alguma molécula contendo proteína da superfície celular.

6.2. Adesão de Células a Solventes Orgânicos

Os métodos de identificação das características da superfície celular baseados na adesão à solventes são métodos de partição que se baseiam na preferência da superfície das células aos solventes ou à água. Do ponto de vista físico-químico, a adesão microbiana é considerada como um conjunto de forças de *van der Waals* de longo alcance e forças eletrostáticas e várias interações de curto alcance (VAN DER MEI *et al.*, 1995). Portanto, os métodos de adesão a solventes identificam as propriedades físico-químicas da superfície celular inclusive o caráter doador e aceptor de elétrons.

6.2.1. Adesão Microbiana a Hidrocarbonetos (teste MATH)

BUSSCHER *et al.* (1995) descreveram que todos os hidrocarbonetos empregados no teste MATH são carregados negativamente em alguns tampões, incluindo na água. Para se garantir que o resultado desse teste não seria influenciado pelo tipo de tampão utilizado, VAN DER MEI *et al.* (1995) propuseram que este teste fosse realizado em diferentes tampões. Portanto, no presente trabalho utilizaram-se três tampões sugeridos pelos autores: PUM, PBS e KPi, cujas composições estão descritos no item 4.11.4.2, com valores de pH ajustados com HCl ou KOH para a faixa de 3 a 9.

Os autores (VAN DER MEI *et al.*, 1995) também propuseram uma modificação no teste MATH, renomeado para MATH cinético, pois avaliaram a influência do tempo de agitação na adesão das células aos hidrocarbonetos. Portanto, o sistema bifásico (células em tampão + hidrocarboneto) é agitado em vortex por 10 segundos e após 10 minutos a absorvância da suspensão aquosa é medida (A_i). Esse procedimento é repetido 10 vezes e a variação temporal do $\log(A_i/A_0 *100)$ é avaliada, sendo A_0 a absorvância inicial da suspensão celular em tampão. Um ajuste linear da curva resulta na taxa de remoção microbiana inicial (R_0, min^{-1}) como medida da adesão de células aos hidrocarbonetos.

Em geral, a adesão de microrganismos a hidrocarbonetos aumenta no ponto isoelétrico da superfície do microrganismo, onde a superfície celular se apresenta sem carga. Adesão significativa ocorre na ausência de repulsão eletrostática, como observado por VAN DER MEI *et al.* (1995). É por isso que a adesão de microrganismos a hidrocarbonetos pode variar com o pH.

Apesar da variação da carga da superfície celular de *Y. lipolytica* com o pH (Figura 6.5), a taxa de remoção microbiana inicial em *n*-hexadecano e tolueno varia muito pouco com a utilização de diferentes tampões (mesmo pH, $\Delta R_0 < 0,32$) ou em pHs diferentes (mesmo tampão, $\Delta R_0 < 0,34$), como mostra a Figura 6.12. Portanto, a adesão a hidrocarbonetos não parece ser influenciada pela carga da superfície deste microrganismo. Levando em consideração que os valores de R_0 não foram afetados significativamente pelo pH ou pelo tipo de tampão, pH 7,0 e o tampão PUM foram escolhidos para a continuação do teste MATH e para o teste de adesão à solventes, que será apresentado no próximo item.

A Figura 6.13 apresenta a taxa de remoção inicial das células de *Y. lipolytica* cultivadas por 48 horas em meio YPD sob agitação de 160 rpm (pré-inóculo) e durante o cultivo em meio YPD* sob agitação de 250 rpm.

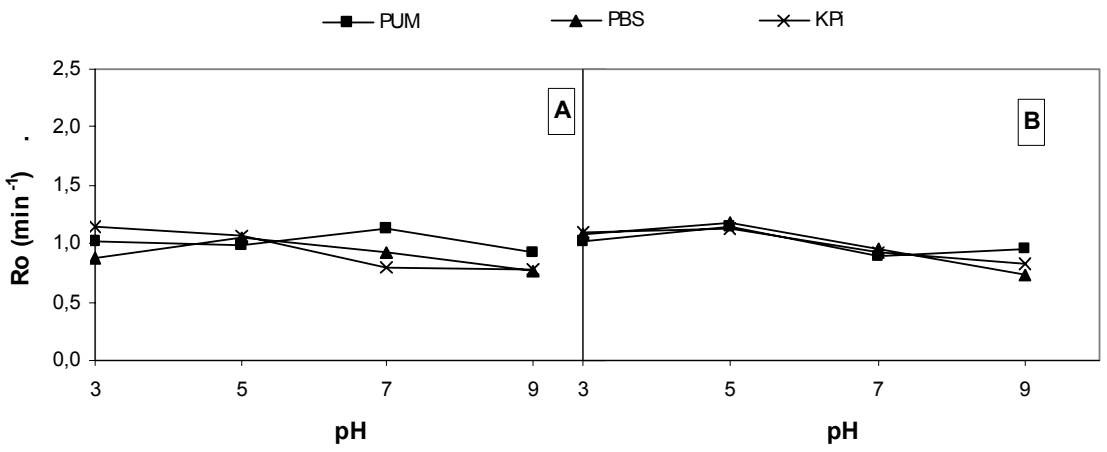

Figura 6.12. Teste MATH realizado com células de *Y. lipolytica* cultivadas por 48 horas em meio YPD. Taxa de remoção microbiana inicial (R_0) por *n*-hexadecano (A) e tolueno (B) como função do pH em diferentes tampões. O desvio padrão ficou entre 4 e 12%.

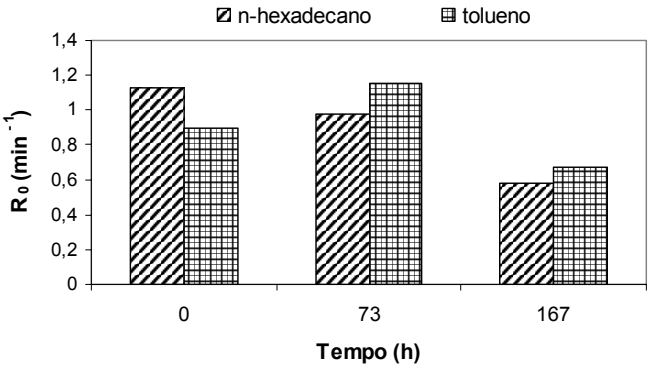

Figura 6.13. Teste MATH realizado com células de *Yarrowia lipolytica* cultivadas em meio YPD* sob agitação de 250 rpm. Taxa de remoção microbiana inicial (R_0) por *n*-hexadecano e tolueno em tampão PUM e pH 7,0. O desvio padrão foi menor que 8%.

É possível observar que a hidrofobicidade das células do pré-inóculo (0 horas), dada pela taxa de remoção microbiana inicial pelos hidrocarbonetos (R_0 = 0,8 a 1,2), é alta se comparado com outras superfícies celulares hidrofóbicas (R_0 = 0,4 – 1,2, (VAN DER MEI *et al.*, 1995). Além disso, nota-se uma pequena redução da hidrofobicidade das células com o tempo de cultivo.

6.2.2. Adesão Microbiana a Solventes (teste MATS)

Esse método de partição é baseado na afinidade das células microbianas a solventes mono-polares e apolares. Foram escolhidos os pares: clorofórmio e *n*-

hexadecano e éter etílico e hexano. Nesse teste, a hidrofobicidade das células é dada pelo percentual de adesão (% de adesão) das células aos solventes.

A Figura 6.14 apresenta a adesão de células de *Y. lipolytica* cultivadas por 48 horas em meio YPD a 160 rpm (pré-inóculo, 0 horas). Além disso, para se observar a influência da presença de perfluorodecalina na superfície da célula, a Figura 6.14 também apresenta o percentual de adesão das células cultivadas sob agitação de 250 rpm em meio YPD* com 20% (v/v) de PFC e na ausência de PFC.

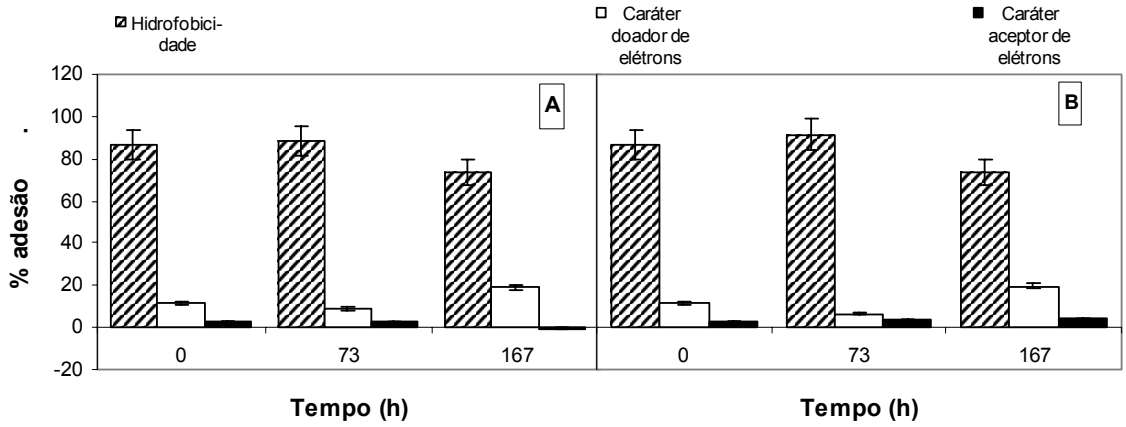

Figura 6.14. Teste MATS realizado com células de *Yarrowia lipolytica* cultivadas em meio YPD sem PFC (A) e com 20% (v/v) de PFC (B) sob agitação de 250 rpm. A hidrofobicidade é avaliada pela adesão de células ao hexadecano: o caráter doador de elétrons é dado pelo % de adesão de células ao clorofórmio menos o % de adesão de células ao hexadecano; o caráter aceptor de elétrons é dado pelo % de adesão de células ao éter etílico menos o % de adesão de células ao hexano.

É possível notar que a hidrofobicidade (expressa pelo percentual de adesão a *n*-hexadecano) da superfície das células do pré-inóculo é bastante alta (87%) quando comparado com outros microrganismos que apresentam superfície celular hidrofóbica, como *Streptococcus thermophilus* (30%) (BELLON-FONTAINE *et al.*, 1996). Além disso, nessas condições a superfície celular de *Y. lipolytica* apresenta um caráter doador de elétrons significativo (CDE, expresso como a diferença entre a adesão celular ao clorofórmio e ao hexadecano) e baixo caráter aceptor de elétrons (CAE, expresso como a diferença entre a adesão de células ao éter etílico e ao hexano).

Em relação ao cultivo na presença e ausência de PFC, os perfis são similares, com uma leve redução na hidrofobicidade da superfície celular com o tempo de cultivo e aumento do caráter doador de elétrons, em relação ao início do cultivo. Esse resultado mostra que parece não haver modificações nas características da superfície celular devido à presença de PFC. Além disso, é possível notar que os resultados do teste MATS e MATH são similares, detectando-se nos dois casos uma pequena redução na

hidrofobicidade da superfície celular com o tempo de cultivo. KAEPPELI e FIECHTER (1976) observaram que a mudança na fonte de carbono do cultivo de *C. tropicalis* de *n*-hexadecano para um substrato hidrofílico, glicose, reduziu a capacidade à adsorção dos microrganismos ao *n*-hexadecano, mostrando que a afinidade do microrganismo ao hidrocarboneto é parcialmente induzida.

Como foi mencionado anteriormente, o teste MATS é baseado na comparação entre a afinidade das células pelo solvente monopolar e apolar, sendo que os dois têm interação de *van der Waals* similares. Portanto, os resultados obtidos com os diferentes pares de solvente indicam que as interações entre as células de *Y. lipolytica* e a fase orgânica estão relacionadas com interações apolares ou de *Lifshitz-van der Waals* e, em menor grau a interações polares ácido-base de *Lewis*.

O teste MATS foi também realizado com a cepa *Y. lipolytica* W29 e com *S. cerevisiae*, com objetivo de comparar as características da superfície celular das diferentes cepas de *Y. lipolytica* entre si e com uma espécie com superfície celular hidrofílica, sob a ótica do teste MATS. Os resultados são apresentados na Tabela 6.7.

Tabela 6.7. Teste MATS (adesão microbiana à solventes) para duas cepas de *Y. lipolytica* e para uma cepa de *S. cerevisiae* do pré-inóculo (células crescidas em meio YPD por 48 horas sob agitação de 160 rpm).

Cepa	MATS test		
	Hidrofob (%)[a]	EDC (%)[b]	EAC (%)[c]
Y. lipolytica IMUFRJ 50682	86,51 ± 6,93	11,10 ± 0,91	2,71 ± 0,20
Y. lipolytica W29 (ATCC20460)	56,81 ± 2,84	22,8 ± 1,14	-9,6 ± 0,46
S. cereviciae ATCC 32167	0,92 ± 0,00	24,61 ± 0,02	12,91 ± 0,02

[a]Hidrofob: Hidrofobicidade – adesão de células ao hexadecano.
[b]CDE: Caráter doador de elétrons – adesão de células ao clorofórmio menos a adesão ao hexadecano.
[c]CAE: Caráter aceptor de elétrons – adesão de células ao éter etílico menos a adesão ao hexano.

É possível observar na Tabela 6.7 um caráter hidrofóbico menor para a superfície de *Y. lipolytica* W29 em comparação com a outra cepa de *Y. lipolytica*. Além disso, identifica-se um maior caráter doador de elétrons, o que corrobora com os resultados de AGUEDO *et al*. (2003). As duas cepas apresentam baixo caráter aceptor de elétrons. Em relação à cepa de *S. cerevisiae*, o teste detecta uma hidrofobicidade quase negligenciável e alto caráter doador e aceptor de elétrons em comparação com as espécies de *Y. lipolytica*. Isso mostra que as interações entre as células de *S. cerevisiae* e a fase orgânica estão relacionadas com interações polares ácido-base de *Lewis*.

Os resultados dos testes MATS e MATH encontram-se de acordo com as informações obtidas por CIH e adesão a poliestireno, em relação à hidrofobicidade da

cepa estudada (*Y. lipolytica* IMUFRJ). Esses resultados contrastam com àqueles obtidos para a outra cepa de *Y. lipolytica* (*Y. lipolytica* W29), que apresenta uma superfície mais hidrofílica. Esse caráter mais hidrofílico para *Y. lipolytica* W29, que também foi detectado por AGUEDO *et al.* (2005), mostra que a alta adesão das células de *Y. lipolytica* IMUFRJ por compostos e superfícies hidrofóbicas é uma particularidade dessa cepa.

O teste MATS foi também realizado com células de *Y. lipolytica* após o tratamento com a mistura de endo e exo-proteases, a pronase. A Figura 6.15 mostra que a hidrofobicidade da superfície celular é reduzida gradativamente durante 180 minutos de tratamento, com uma redução substancial de, aproximadamente, 55% na hidrofobicidade da superfície celular. Após esse tempo, não há redução significativa.

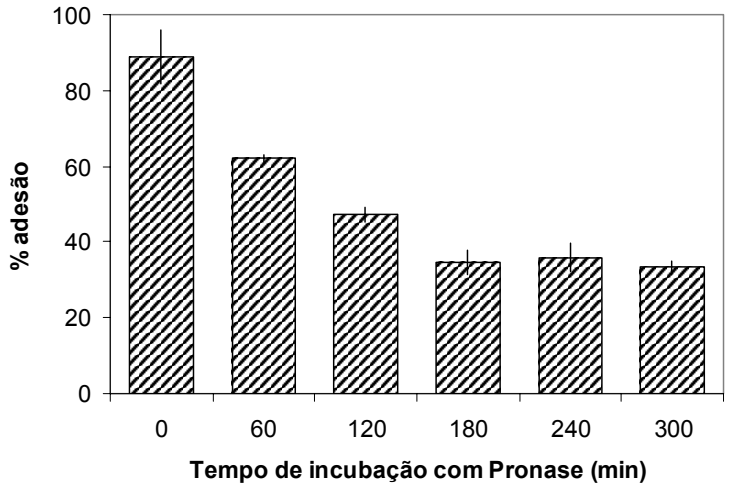

Figura 6.15. Hidrofobicidade da superfície celular dada pelo teste MATS realizado com células de *Y. lipolytica* cultivadas em meio YPD por 48 horas sob agitação de 160 rpm e tratadas com pronase.

Os resultados do teste MATS com as células tratadas com pronase estão em concordância com os resultados da CIH em relação à redução da hidrofobicidade das células, o que reforça a suposição de que parte da preferência da superfície celular de *Y. lipolytica* por compostos hidrofóbicos estaria relacionada com moléculas contendo proteína na superfície das células.

A Figura 6.16 apresenta o teste MATS completo para as células de *Y. lipolytica* cultivadas em meio YPD por 48 horas sob agitação de 160 rpm sem tratamento com pronase e após 180 minutos de incubação com pronase. É possível observar um aumento do caráter doador e aceptor de elétrons com o tratamento. Isso mostra que após a degradação das proteínas da superfície celular, as interações entre as células de *Y.*

lipolytica e a fase orgânica passam a estar mais relacionadas com interações polares ácido-base de *Lewis*.

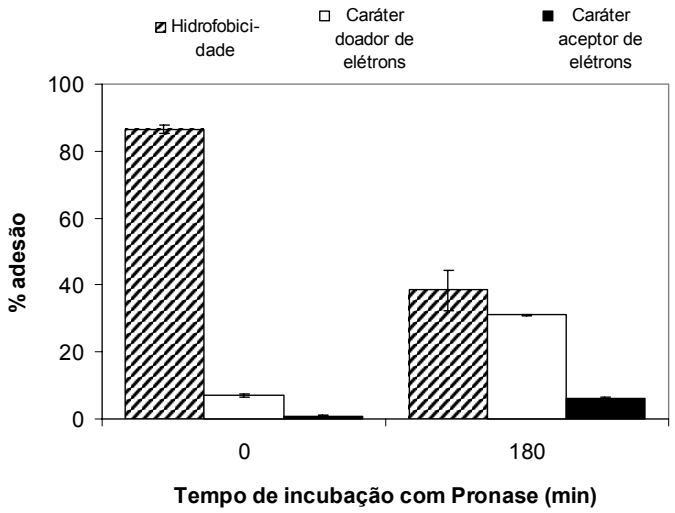

Figura 6.16. Teste MATS realizado com células de *Y. lipolytica* cultivadas em meio YPD por 48 horas sob agitação de 160 rpm e tratadas com pronase.

Para confirmar que o tratamento com pronase estava realizando alguma modificação na superfície da célula e identificá-la, foi realizada a análise de espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS) com as células antes e depois do tratamento com pronase por 180 minutos. Essa análise revelou que a superfície das células sem o tratamento com pronase era constituída de 51,0% de carbono, 5,9% de nitrogênio e 41,8% de oxigênio e para as células após o tratamento com pronase a análise indicou a presença de 49,6% de carbono, 3,8% de nitrogênio e 45,7% de oxigênio. Nota-se não apenas uma redução no conteúdo de nitrogênio, mas também uma mudança no seu estado de oxidação, como mostra a Figura 6.17.

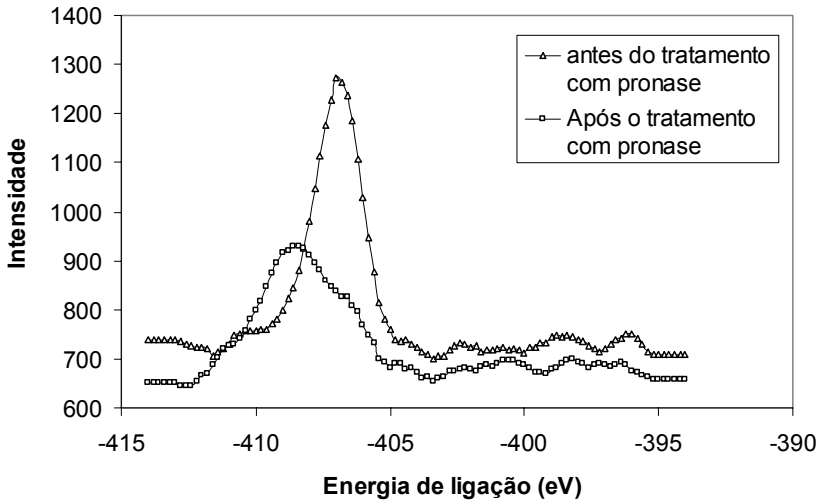

Figura 6.17. Análise de espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS) de células de *Y. lipolytica* antes e depois do tratamento com pronase.

Após o tratamento com pronase o pico do nitrogênio indica que a superfície sofreu uma modificação química e que mais de um tipo de ligação com nitrogênio estaria presente. A mudança para maiores valores absolutos de energia de ligação indica a oxidação do nitrogênio. Essa análise sugere que grande parte da proteína presente na superfície celular foi degradada. Portanto, as mudanças no comportamento da superfície celular após o tratamento com pronase mostram a importância da proteína no caráter hidrofóbico da superfície celular.

O baixo valor de PI e a pequena influência do pH no teste MATH para as células de *Y. lipolytica* indicam que o comportamento da superfície não é resultado do envolvimento direto das proteínas nas interações entre a superfície celular e os compostos orgânicos, já que a estrutura conformacional das proteínas é bastante influenciada pelo pH e o PI associado a proteínas é geralmente maior devido à presença dos grupos NH_2 (RIJNAARTS *et al.*, 1995a). O baixo valor de PI para a superfície celular de *Y. lipolytica* IMUFRJ (2,4) indica que as cargas resultam, principalmente, de grupos COO^- e, portanto, de polissacarídeos. Ainda assim, após o tratamento com pronase a interação entre as células e o hexadecano reduziu substancialmente. No entanto, a presença de outras enzimas líticas em algumas preparações de pronase já foi reportada (KOLLAR *et al.*, 1997). Portanto, outros componentes da parede celular poderiam também ter sido degradados. A análise de XPS mostra a redução de nitrogênio da superfície celular e uma mudança no seu estado de oxidação. Isso indica que de fato as proteínas da superfície celular foram removidas pela pronase, deixando uma superfície celular diferente exposta, que parece ser menos hidrofóbica que a original. Essas proteínas podem ser glicosiladas formando glicoproteínas que seriam responsáveis pela adesão entre os compostos hidrofóbicos e a superfície celular.

6.2.3. Medida do Ângulo de Contato (MAC)

A energia da superfície celular (tensão superficial) foi investigada através da técnica da gota séssil. Os ângulos de contato foram medidos diretamente das imagens do menisco sólido-líquido da gota de líquido colocada em um filme de células, utilizando uma câmera digital. Foi obtida a média para cinco medidas separadas a fim de se obter um valor representativo do ângulo de contato para cada superfície estudada (filme de células). Os resultados para os ângulos de contato medidos nos filmes de células de *Y. lipolytica* com os líquidos empregados (água, diiodometano e formamida) estão listados na Tabela 6.8.

Tabela 6.8. Medida do ângulo de contato para células de *Y. lipolytica* IMUFRJ e *Y. lipolytica* W29 crescidas em meio YPD por 48 horas a 160 rpm (pré-inóculo) e para células de *Y. lipolytica* IMUFRJ cultivadas em meio YPD* por 170 horas sob agitação de 250 rpm com e sem PFC.

Células de *Y. lipolytica*	Água (º)	Diiodometano (º)	Formamida(º)
IMUFRJ, pré-inóculo	28,0 ± 3,4	76,9 ± 3,4	29,6 ± 2,1
IMUFRJ, 170h, 0% PFC	26,0 ± 0,7	62,2 ± 6,6	34,4 ± 1,4
IMUFRJ, 170h, 20% PFC	25,7 ± 0,7	80,7 ± 1,9	31,3 ± 3,7
W29, pré-inóculo	27,4 ± 1,9	60,1 ± 0,7	41,0 ± 1,4

Os valores do ângulo de contato formados com a água podem fornecer informações preliminares sobre a hidrofobicidade da superfície celular. Para todas as condições estudadas, o ângulo de contato entre a água e as células de *Y. lipolytica* IMUFRJ é menor que 50º e maior que 20º, indicando um caráter hidrofóbico intermediário, segundo a definição de RIJNAARTS *et al*. (1995a). Não há uma diferença significativa entre a afinidade da água pelo filme de células (redução no ângulo de contato) com o cultivo dessas células em meio YPD* durante 170 horas, com ou sem PFC, o que segue a mesma tendência dos resultados do teste MATH e MATS, que também indicam que não há modificações na superfície das células cultivadas na presença de PFC. Em relação ao ângulo de contato formado com a superfície de células de *Y. lipolytica* W29 há uma similaridade entre as superfícies das duas cepas de *Y. lipolytica*.

Através dos dados da Tabela 6.8 e das equações apresentadas no item 4.11.5, foi possível obter os valores de tensão superficial e de energia livre de interação para os filmes de células de *Y. lipolytica*, como mostra a Tabela 6.9.

Tabela 6.9. Componentes da tensão superficial e energia livre das interações para células de *Y. lipolytica* IMUFRJ e *Y. lipolytica* W29 crescidas em meio YPD por 48 horas a 160 rpm (pré-inóculo) e para células de *Y. lipolytica* IMUFRJ cultivadas em meio YPD* por 170 horas sob agitação de 250 rpm com e sem PFC.

Cepas de *Y. lipolytica*	γ^{LW} [mJ m^{-2}]	γ^{+} [mJ m^{-2}]	γ^{-} [mJ m^{-2}]	γ^{AB} [mJ m^{-2}]	γ^{TOT} [mJ m^{-2}]	ΔG_{mwm} [mJ m^{-2}]	$\Delta G_{mwh}{}^{a}$ [mJ m^{-2}]
IMUFRJ, pré-inóculo	19,1	6,9	47,8	36,2	55,3	17,9	-5,4
IMUFRJ, 170 h, 0% PFC	27,3	2,1	54,8	21,5	48,7	33,3	-13,2
IMUFRJ, 170 h, 20% PFC	17,1	7,4	51,2	38,9	56,1	19,1	-1,6
W29, pré-inóculo	28,5	0,9	59,9	14,4	42,9	43,5	-15,2

[a]ΔG_{mwh} – energia livre das interações entre células (m) e hexadecano (h) imersos na água (w) calculados pela equação de Dupré (VAN OSS, 1995).

A afinidade das células pela fase aquosa se torna evidente com o valor positivo da energia livre de interação entre o filme de células e a água (ΔG_{mwm}). Um valor negativo para esse parâmetro indicaria a tendência das células agregarem quando presentes em fase aquosa (VAN OSS, 1995), o que, de fato, não é observado para as células de *Y. lipolytica* quando dispersas em meio YPD, YPD* ou em água.

A partir da Tabela 6.9 pode ser observado que o componente positivo *Lewis* ácido-base (γ^{+}) é bem menor que o componente negativo (γ^{-}), o que implica em um caráter doador de elétrons da superfície celular, que está de acordo com os resultados do teste MATS. VAN OSS (1997) reportou que a grande maioria das bio-superfícies é predominantemente doadora de elétrons como conseqüência da predominância de oxigênio na atmosfera terrestre (baixa altitude) e da hidratação da superfície celular microbiana.

O aumento no componente negativo da tensão superficial é observado para as células cultivadas em meio YPD* com e sem PFC em relação às células do pré-inóculo (cultivadas em meio YPD), mesmo comportamento observado pelo teste MATS. No entanto, para os outros componentes de tensão superficial há diferenças entre as células cultivadas com e sem PFC, divergindo dos resultados desse mesmo teste. Pela Tabela 6.9, segundo o parâmetro ΔG_{mwm}, quando as células são cultivadas com PFC sua superfície tente a ficar ligeiramente menos hidrofóbica que as células do pré-inóculo, podendo se dizer que a superfície tende a manter a hidrofobicidade, já que essa redução é bem sutil. As células cultivadas sem PFC tentem a apresentar uma superfície mais hidrofílica.

A Tabela 6.9 também mostra que *Y. lipolytica* W29 apresenta um caráter mais hidrofílico em relação a *Y. lipolytica* IMUFRJ, segundo o parâmetro ΔG_{mwm}, o que está de acordo com o que foi observado nos testes MATS e CIH.

Por definição, compostos, células, partículas ou superfícies hidrofóbicas são as que apresentam $\Delta G_{mwm} < 0$, enquanto que compostos, células, partículas ou superfícies hidrofílicas são as que apresentam $\Delta G_{mwm} \geq 0$ (VAN OSS, 1995). Como a medida de ângulo de contato mede exclusivamente a hidrofobicidade da superfície celular e não os fatores físico-químicos e estruturais envolvidos na adesão, é possível se afirmar que a superfície das células de *Y. lipolytica* IMUFRJ é hidrofílica. Apesar desse resultado parecer ser inconsistente como os testes de adesão, os valores negativos para a energia livre das interações entre as células e hexadecano imersas em água (ΔG_{mwh}) mostram que a atração entre a superfície celular e o hidrocarboneto é termodinamicamente favorável quando estes estão imersos na água. De fato, quando as células de *Y. lipolytica* são inoculadas diretamente em fase orgânica a partir de um cultivo sólido, elas não dispersam. Uma fase aquosa é necessária para as células interagirem com perfluorocarbonetos ou hidrocarbonetos. VAN OSS (1995) afirmou que atrações hidrofóbicas podem prevalecer entre um ponto hidrofóbico e outro hidrofílico imersos em água, pois atrações hidrofóbicas ocorrem principalmente devido a energia livre de coesão das ligações hidrogênio das moléculas da água do meio líquido no qual as moléculas estão imersas.

Pela medida de ângulo de contato, as células de *Y. lipolytica* W29 e *Y. lipolytica* IMUFRJ apresentam características parecidas, enquanto que pelos testes MATS, CIH e adesão a superfícies, estas superfícies celulares apresentam comportamentos bem distintos. A medida de ângulo de contato é indiscutivelmente um excelente método para se medir hidrofobicidade de superfícies, mas é importante se combinar os resultados desse método com outros testes para se caracterizar uma superfície celular e seu comportamento de interação com outras superfícies, líquidos ou moléculas.

6.3. Conclusões Parciais do Capítulo 6

Y. lipolytica IMUFRJ 50682 apresenta alta adesão a superfícies com características bem diferentes, como poliestireno e vidro, independentemente do pH. Ácidos glucurônicos ou outros grupos carboxila associados à polissacarídeos da parede celular de *Y. lipolytica* IMUFRJ podem inibir a adesão celular na presença de alta força iônica (0,1 M) devido a interações estéricas.

A deposição de filmes de organosilicone (HMDSO) ou similares ao teflon (C_4F_8) em superfícies de policarbonato reduz a compatibilidade (adesão) dessas superfícies com as células de *Y. lipolytica*. No caso dos filmes de HMDSO, o aumento do tempo de deposição do fluxo de HMDSO previne a adesão de células de *S. cerevisiae* e mantém a adesão de células de *Y. lipolytica*, o que permite uma adesão seletiva. Com os filmes do tipo teflon o tratamento das superfícies levou a uma maior interação das células de *Y. lipolytica*, que após um experimento que simulou as condições de fluxo encontradas em biorreatores de leito fixo, permaneceram mais aderidas às superfícies tratadas do que na não tratada.

Pela definição de VAN OSS (1995), a superfície das células de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 pode ser caracterizada como hidrofílica, apresentando, no entanto, alta afinidade com superfícies, líquidos ou moléculas hidrofóbicas quando imersas em água. A interação entre as células e as superfícies ou compostos hidrofóbicos é mediado por proteínas ou glicoproteínas da parede celular. Além disso, as interações observadas entre as células e solventes apolares estão ligadas a interações apolares ou *Lifshitz-van der Waals*.

7. DETECÇÃO E PURIFICAÇÃO DO EMULSIONANTE PRODUZIDO POR *Y. LIPOLYTICA*

A interação entre microrganismos e compostos hidrofóbicos pode ocorrer através de adsorção direta das gotas hidrofóbicas à superfície celular ou pode ser mediada por um surfactante (CIRIGLIANO e CARMAN, 1984). A presença de agentes emulsionantes pode ajudar na redução e/ou estabilização das gotas da fase orgânica, o que facilita o contato e a transferência de substratos (GUTIERREZ e ERICKSON, 1977).

Através dos resultados do Capítulo 6 foi possível detectar que moléculas glicoprotéicas da superfície celular de *Y. lipolytica* IMUFRJ seriam responsáveis pela alta interação entre as células e a fase orgânica. No entanto, agentes emulsionantes produzidos pela própria célula também poderiam contribuir para essa interação. De forma a conhecer todos os fatores responsáveis pela adesão das células ao PFC e, assim, poder controlar essa interação, a presença de agentes emulsionantes no meio de cultivo de *Y. lipolytica* foi investigada.

Como será visto nos itens a seguir, a cepa de *Y. lipolytica* utilizada no presente trabalho produz bioemulsionante nas condições de cultivo estudadas. O bioemulsionante produzido foi isolado e caracterizado de forma a conhecer o composto que influencia na adesão das células à fase orgânica, além de ser um potencial produto para futuras aplicações.

7.1. Produção de Agentes Emulsionantes por *Y. lipolytica*

A literatura reporta que *Y. lipolytica* produz emulsionantes, principalmente, induzidos pela presença de substratos orgânicos (CIRIGLIANO e CARMAN, 1984; ZINJARD e PANT, 2002). Como o meio de cultivo utilizado para produção de lipase em presença de PFC foi realizado utilizando glicose como fonte de carbono, investigou-se a presença de atividade emulsionante no meio de produção de lipase com e sem perfluorodecalina. Além disso, investigou-se a influência da agitação na produção desses agentes emulsionantes.

A Figura 7.1 apresenta os perfis de atividade emulsionante e crescimento celular de *Y. lipolytica* cultivada em *Erlenmeyers* de 500 mL com 200 mL de meio YPD*.

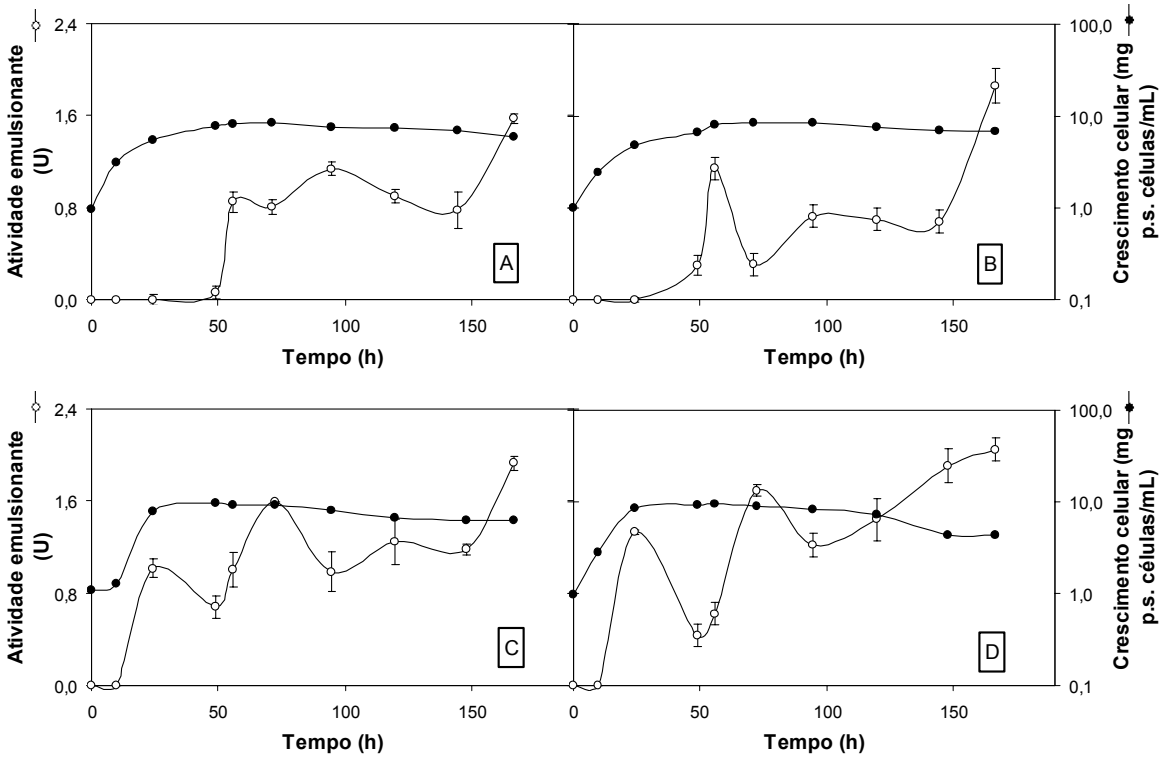

Figura 7.1. Atividade emulsionante e crescimento celular de *Y. lipolytica* em meio YPD. (A) Frasco agitado a 160 rpm, 0% perfluorodecalina; (B) Frasco agitado a 160 rpm, 20% perfluorodecalina; (C) Frasco agitado a 250 rpm, 0% perfluorodecalina; (D) Frasco agitado a 250 rpm, 20% perfluorodecalina.

É possível observar na Figura 7.1 que os perfis de atividade emulsionante apresentam valores expressivos de atividade se comparados com a atividade emulsionante obtida por CIRIGLIANO e CARMAN (1984) para um cultivo de *C. lipolytica* com hexadecano como fonte de carbono (1,2 U de atividade). Foram obtidos maiores valores quando o sistema foi agitado a 250 rpm do que para a agitação de 160 rpm que ainda apresentou uma produção tardia da atividade emulsionante. A maior velocidade de agitação promove uma melhor transferência de oxigênio, o que aumenta a taxa específica de crescimento celular de *Y. lipolytica* devido ao seu metabolismo estritamente aeróbio.

Os maiores valores de atividade emulsionante detectados para os cultivos agitados em maior velocidade podem estar ligados à função fisiológica dos emulsionantes microbianos. Tem sido sugerido que a produção de bioemulsionantes pode aumentar a solubilização de substratos insolúveis em água e, conseqüentemente, facilitar o transporte de nutrientes para os microrganismos. Portanto, um maior estresse cisalhante pode induzir maior excreção de emulsionantes já que o contato das gotas da fase orgânica, dispersas em água, com os microrganismos se torna mais difícil. DESAI

e BANAT (1997), em sua revisão, reportaram alguns resultados contrários da literatura para *Norcadia erythropolis* e *Acinetobacter calcoaceticus* que produziram menos biosurfactantes com o aumento do estresse cisalhante. No entanto, eles também mencionaram que no caso de leveduras, geralmente, a produção de biosurfactante aumenta com maiores velocidades de agitação e aeração.

Os perfis de atividade emulsionante apresentados na Figura 7.1 para os cultivos realizados na presença e ausência de perfluorodecalina são similares para as mesmas velocidades de agitação dos sistemas. Apesar da presença de perfluorodecalina influenciar o crescimento celular e a produção de lipase, sua inclusão não afetou significativamente a produção do emulsionante nas condições testadas. Isso reforça a suposição de que o aumento da atividade emulsionante no meio de cultivo com maior velocidade de agitação não seria pela maior transferência de oxigênio e sim pelo aumento do estresse de cisalhamento.

De forma a caracterizar o bioemulsionante produzido e, assim, identificar sua interação com a perfluorodecalina no meio de cultivo de *Y. lipolytica* para a produção de lipase, este foi isolado do extrato livre de células do cultivo de *Y. lipolytica* em meio YPD* por 170 horas sob agitação de 250 rpm. Como a perfluorodecalina não é consumida pelo microrganismo, o bioemulsionante produzido em sua ausência ou presença apresenta, provavelmente, as mesmas características e, portanto, a perfluorodecalina não foi utilizada para a produção do bioemulsionante. Através das técnicas de isolamento descritas na literatura (CIRIGLIANO e CARMAN, 1984) e adaptadas como descrito no item 4.12.4, o bioemulsionante, denominado Yansan, foi obtido como um pó, de coloração creme.

Apesar de a maioria dos bioemulsionantes serem produzidos durante a fase estacionária do crescimento celular (CIRIGLIANO e CARMAN, 1984), atividade emulsionante significativa foi detectada durante a fase exponencial de crescimento de *Y. lipolytica* (Figura 7.1) quando o sistema foi agitado a 250 rpm. Entretanto, foi detectada atividade emulsionante máxima em 170 horas e, para garantir um maior rendimento, escolheu-se esse tempo de cultivo para a obtenção do extrato e posterior isolamento do bioemulsionante.

7.2. Caracterização Química do Yansan

O bioemulsionante foi submetido à análise de FTIR com o objetivo de identificar os principais grupos funcionais presentes no Yansan. No espectro de FTIR detectou-se a presença de uma banda larga entre 3650 e 3200 cm^{-1}, que é indicativa de

um conteúdo de água e O-H, típico de polissacarídeos. O espectro também mostrou uma banda intensa em 1654 cm^{-1} indicativa de ligações duplas entre carbono e oxigênio, presente no grupo cetona (υ C=0, cetona) e outra banda em 1060 cm^{-1} indicativa de ligação éster (υ C-0-C, ésteres). O espectro de FTIR sugeriu que o bioemulsionante é predominantemente um polissacarídeo, embora um conteúdo protéico esteja presente.

Através do método descrito por LOWRY *et al.* (1951), o conteúdo protéico do bioemulsionante foi estimado em 15%. Esse resultado foi confirmado pela análise de espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS). A análise de XPS revelou que o Yansan contém 62,1% de carbono, 7,8% de nitrogênio, 29,2% de oxigênio e 0,6% de enxofre. A presença de enxofre indica que cisteína e/ou metionina podem ser aminoácidos presentes na constituição do bioemulsionante. Embora alguma metionina residual estivesse presente no conteúdo protéico do bioemulsionante estudado por ZINJARDE *et al.* (1997), um conteúdo muito maior de metionina seria necessário para explicar o conteúdo de enxofre obtido para o Yansan. Por outro lado, a cisteína que é um aminoácido encontrado em manoproteínas da parede celular de leveduras (RAMON *et al.*, 1999) seria uma explicação mais plausível para a presença de enxofre no bioemulsionante.

O conteúdo lipídico encontrado foi menor do que o limite de detecção da metodologia (1%). Apesar do baixo conteúdo, foi possível identificar os principais ácidos graxos presentes, como o ácido palmítico (35,8%), ácido esteárico (21,4%), ácido láurico (8,8%) e, em menor conteúdo, ácido oléico (6,9%).

Os monossacarídeos do bioemulsionante isolado foram identificados como arabinose, galactose, glicose e manose (1:6:17:31). ZINJARD *et al.* (1997) reportaram que o bioemulsionante produzido por *Y. lipolytica* NCIM 3589 apresenta um conteúdo de açúcar de apenas 20% constituído de manose e galactose, e também sem a presença de açúcares aminados. Ao contrário disso, CIRIGLIANO e CARMAN (1985) reportaram a presença de galactosamina e ácidos urônicos no Liposan, o bioemulsionante produzido por *C. lipolytica* ATCC 8662.

O peso molecular do bioemulsionante foi detectado por espectrometria de massa. O sinal só foi detectado utilizando ácido sinapínico, que é a matriz indicada para amostras glicoprotéicas. O espectro de massa obtido para o Yansan apresentou um largo pico com o máximo em 20.000 m z^{-1}, que é o peso molecular da subunidade do complexo, não muito diferente do valor obtido para o Liposan que foi estimado em 27.600 Da (CIRIGLIANO e CARMAN, 1985).

A caracterização química descrita indica que o Yansan consiste em um complexo polissacarídico-proteico com um pequeno conteúdo lipídico. A maioria dos bioemulsionantes caracterizados e reportados na literatura tem sido identificada como

glicolipídios (COOPER e PADDOCK, 1983; CIRIGLIANO e CARMAN, 1985), lipoproteínas (JAVAHERI *et al.*, 1985), ou ainda complexos de proteína-carboidrato-lipídio (SARRUBO *et al.*, 2001; ZINJARD *et al.*, 1997). A Tabela 7.1 apresenta a composição dos bioemulsionantes produzidos por *Y. lipolytica.* SARRUBO *et al* (2001) produziram um biosurfactante obtido a partir de um cultivo de *Y. lipolytica* na presença de glicose como fonte de carbono, que consiste de 47% de proteína, 45% de carboidrato e 5% de lipídeos. Embora produzido na presença da mesma fonte de carbono, o Yansan apresenta um conteúdo protéico e lipídico muito menor (15% de proteína e menos de 1% de lipídeos). Outro emulsionante produzido por *Y. lipolytica* (ZINJARD *et al.*, 1997) só que na presença de hexadecano como fonte de carbono é também um complexo proteína-carboidrato-lipídio, com um conteúdo protéico ainda menor, 5%, e alta concentração lipídica, 75%. O liposan, produzido na presença de substrato hidrofóbico, hexadecano, por outra cepa de *Y. lipolytica* não contém lipídeos em sua constituição, apenas carboidratos (83%) e proteína (17%) (CIRIGLIANO e CARMAN, 1985). SAR e ROSEMBERG (1983) demonstraram que o conteúdo protéico desses polímeros tem um papel muito importante na atividade emulsionante. De fato, as manoproteínas extraídas da parede celular das leveduras, apresentam altas propriedades emulsionantes (CAMERON *et al.*, 1988; LUKONDEH *et al.*, 2003; TORABIZADEH *et al.*, 1996) devido à presença dos polímeros de manose que são hidrofílicos ligados covalentemente a esqueletos de proteína que fornece a estrutura anfifílica comum dos agentes surfactantes (LUKONDEH *et al.*, 2003).

Tabela 7.1. Composição dos biomeulsionantes produzidos por *Y. lipolytica* apresentados na litarura.

Emulsionante	Referência	Carboidra-tos (%)	Proteína (%)	Lipídios (%)
Yansan	Presente trabalho	> 84	15	< 1
Liposan	CIRIGLIANO e CARMAN (1985)	83	17	-
Complexo proteína-carboidrato-lipídio	ZINJARD *et al.* (1997)	20	5	75
Complexo proteína-carboidrato-lipídio	SARRUBO *et al.* (2001)	45	47	5

7.3. Caracterização Físico-química do Yansan

Um dos parâmetros mais utilizados para se caracterizar emulsionantes é a concentração micelar crítica (CMC). A CMC é a solubilidade de um emulsionante em uma fase aquosa ou a mínima concentração de emulsionante requerida para alcançar os

menores valores de tensão superficial ou interfacial (LIN, 1996). A CMC do Yansan foi medida pelo método de titulação turbidimétrica (ABED *et al.*, 2004) e a curva de titulação é apresentada na Figura 7.2.

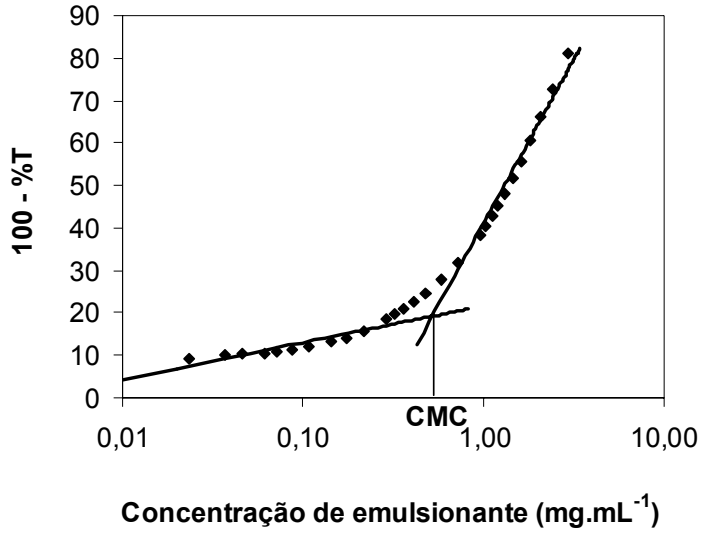

Figura 7.2. Medida da CMC do Yansan pelo método da titulação turbidimétrica, sendo %T: transmitância.

De forma a comparar com outros agentes emulsionantes, a CMC de polissacarídeos naturais foi medida e os resultados são apresentados na Tabela 7.2. A goma arábica e a goma xantana são polímeros naturais, utilizados muitas vezes como emulsionantes na indústria de alimentos. O Yansan apresenta um valor de CMC inferior ao da goma arábica e próximo do valor da goma xantana, o que significa que a quantidade de Yansan necessária para dispersar compostos orgânicos é próxima ao desses bioemulsionantes comerciais.

Tabela 7.2. CMC do Yansan, da goma arábica e da goma xantana obtidas pelo método da titulação turbidimétrica.

Emulsionante	CMC (mg mL^{-1})
Yansan	0,50
Goma Arabica	1,65
Goma Xantana	0,30

O potencial zeta do Yansan foi determinado em função do pH, como mostra a Figura 7.3. As moléculas de Yansan apresentam um ponto isoelétrico (PI) ácido em pH 2,3 e carga negativa em sua superfície em torno de -30 mV para pH maior que 4,0. Um

ponto isoelétrico maior (4,0), mais ainda ácido, foi reportado para um biosurfactante produzido por *Y. lipolytica* NCIM 5389 (ZINJARD *et al.*, 1997).

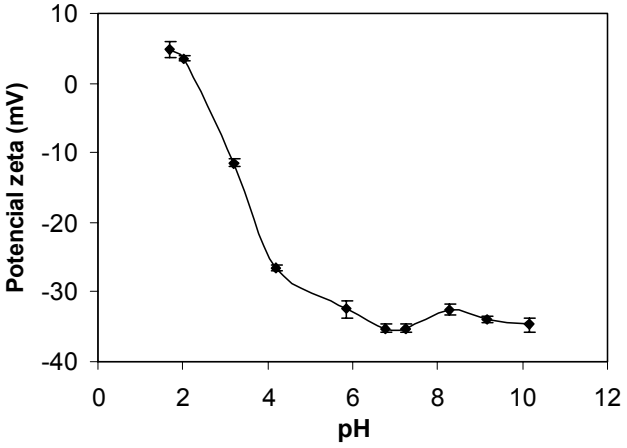

Figura 7.3. Potencial zeta em função do pH para uma amostra contendo 100 mg de Yansan em 50 mL de KCl 10^{-3} M.

As características de superfície do Yansan foram também investigadas em relação à tensão superficial e seus componentes, obtidos através de medidas de ângulo de contato sobre um filme de emulsionante com os líquidos de diagnóstico (água, diiodometano e formamida), como mostra a Tabela 7.3.

Tabela 7.3. Valores de ângulo de contato e tensão superficial para o Yansan.

Ângulo de contato (º)			Tensão superficial ($mN.m^{-1}$)					
água	diiodometano	Formamida	γ^{LW}	γ^{+}	γ^{-}	γ^{AB}	γ^{TOT}	ΔG^{TOT}
55,7	42,3	63,4	38,43	1,14	43,64	14,11	52,51	20,11

Pode-se notar que o componente apolar da tensão superficial (γ^{LW}) do Yansan é muito maior que seu componente polar (γ^{AB}), o que significa que a parte hidrofóbica dessa molécula anfifílica é maior de que a parte hidrofílica. O componente negativo do componente ácido-base de *Lewis*, γ^{AB} (γ^{-}) é maior do que o componente positivo (γ^{+}), indicando que o Yansan tem um caráter doador de elétrons, o que confirma os resultados obtidos pelo potencial zeta. A energia livre de interação entre as moléculas de Yansan (ΔG^{TOT}) é positiva, demonstrando que elas têm mais afinidade pela água do que entre elas.

7.4. Propriedades das Emulsões formadas com Yansan

As propriedades de diferentes emulsões formadas com um emulsionante são essenciais para caracterizá-lo, pois um emulsionante pode ter alta atividade emulsionante com um composto orgânico e baixa com outro, pode ainda ter alta atividade emulsionante e baixa estabilidade ou vice-versa. Portanto, para fins de aplicação de um emulsionante ou mesmo para se conhecer seu comportamento frente a um dado composto, é importante estudar as propriedades das emulsões.

7.4.1. Atividade Emulsionante de Emulsões formadas com Yansan

Para identificar a quantidade de hexadecano ótima emulsionada por 30 mg de Yansan, variou-se a quantidade do hidrocarboneto de 15 a 3000 mg, medindo-se a atividade emulsionante das emulsões formadas. A Figura 7.4 mostra os perfis obtidos para a atividade emulsionante.

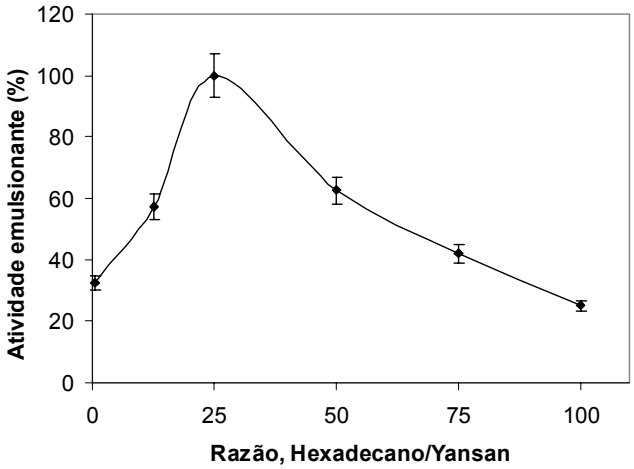

Figura 7.4. Efeito da concentração de hexadecano na atividade emulsionante formada por Yansan. A atividade emulsionante foi medida com 30 mg de Yansan e a quantidade de hexadecano variando de 15 a 3000 mg.

Atividade emulsionante máxima foi obtida quando a razão de hexadecano para Yansan foi 25:1 (p/p). Maiores ou menores razões resultaram em atividades mais baixas. Os estudos posteriores foram realizados utilizando essa razão de hidrocarbonetos ou perfluorocarbonetos para os emulsionantes testados.

O efeito do pH na atividade emulsionante e estabilidade de emulsões foi estudado com Yansan e alguns surfactantes comerciais, *Pluronic* F-68, goma arábica e *Tween* 80, de forma a comparar os resultados, conforme apresentados na Figura 7.5.

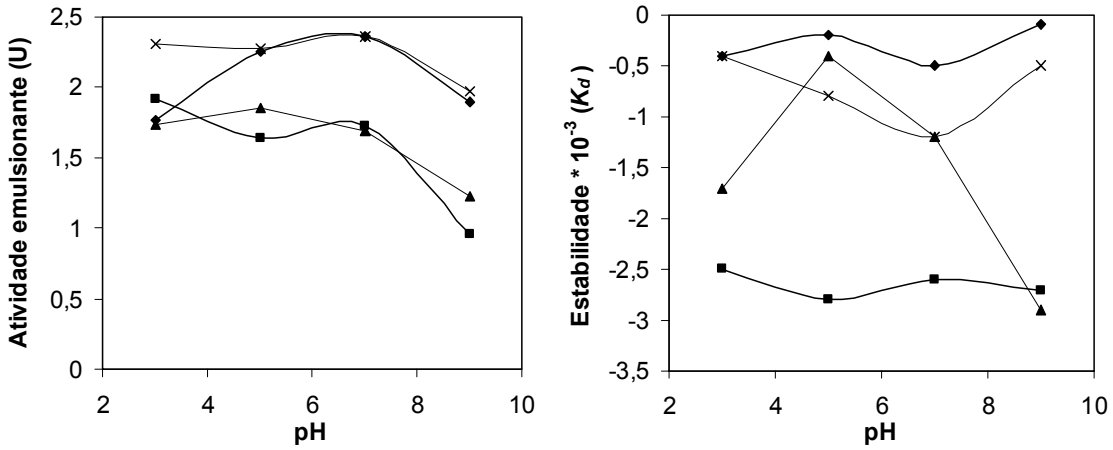

Figura 7.5. Efeito do pH na atividade emulsionante e estabilidade das emulsões formadas com hexadecano e Yansan (♦), *Tween* 80 (x), *Pluronic* F-68 (▲) e goma arábica (■). O desvio padrão foi menor que 10%.

O *Pluronic* e a goma arábica mostram uma tendência de perder atividade com o aumento do pH e apresentam valores de atividade emulsionante menores que o Yansan. A atividade emulsionante com o *Tween* quase não foi afetada pelo pH, como é esperado para um surfactante não iônico, e para valores de pH maiores que 5,0, apresenta atividade emulsionante similar ao Yansan. Os resultados da Figura 7.5 também mostram que a constante de decaimento (K_d) para o Yansan é maior do que para todos os outros surfactantes estudados, indicando que suas emulsões são mais estáveis e essa estabilidade é quase independente do pH.

Como ZINJARDE *et al* (1997) reportaram que o emulsionante produzido por *Y. lipolytica* NCIM 3589 não era capaz de emulsionar *n*-alcanos e o Liposan caracterizado por CIRIGLIANO e CARMAN (1984) apresentou atividade emulsionante extremamente baixa para hidrocarbonetos de cadeia curta (de hexano a decano), vários hidrocarbonetos alifáticos foram utilizados para medida de atividade emulsionante e estabilidade com o Yansan. Os resultados estão apresentados na Figura 7.6.

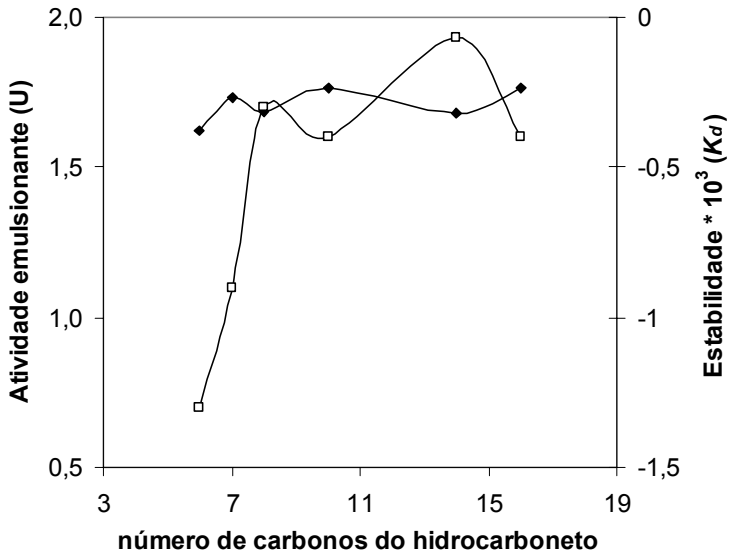

Figura 7.6. Efeito do número de carbonos da cadeia carbônica de hidrocarbonetos alifáticos na atividade emulsionante (♦) e estabilidade (□) de emulsões com Yansan.

O Yansan apresentou atividade emulsionante maior que 1,5 U com todos os hidrocarbonetos testados, sendo, portanto, alta e independente da cadeia carbônica. A estabilidade das emulsões aumenta com o aumento da cadeia carbônica até o octano, após o qual a estabilidade se torna independente do tamanho do hidrocarboneto. Com parafina líquida (dado não apresentado na figura) a atividade emulsionante foi também bastante elevada (1,95 U) assim como a estabilidade (- 0,3 * 10^3).

O Yansan foi capaz de formar emulsões óleo em água com hidrocarbonetos aromáticos, como tolueno, xileno e estireno, com atividades emulsionantes bastante elevadas, maiores do que com hidrocarbonetos alifáticos, como pode ser observado na Tabela 7.4.

Tabela 7.4. Atividade emulsionante e estabilidade das emulsões formadas com hidrocarbonetos aromáticos e o Yansan e estabilidade das emulsões sem Yansan.

Fase Orgânica	Atividade emulsionante (U)	Estabilidade K_d (10^{-3})		Diferença
		Sem Yansan	Com Yansan	
Tolueno	2,63	-19,7	-0,3	19,4
Xileno	2,41	-4,2	-1,5	2,7
Estireno	2,42	-16,9	0,08	17,0

As atividades emulsionantes das emulsões formadas com Yansan e hidrocarbonetos aromáticos foram maiores do que aquelas obtidas por CIRIGLIANO e

CARMAN (1984) para o Liposan, que apresentou atividade emulsionante inferior a 0,75 U com hidrocarbonetos aromáticos. Embora o surfactante produzido por *Y. lipolytica* NCIM 3589 (ZINJARD *et al.*, 1997) tenha apresentado maiores atividades emulsionantes com hidrocarbonetos aromáticos, o Yansan formou emulsões tanto com hidrocarbonetos aromáticos como com os alifáticos, o que não foi o caso do outro emulsionante. A estabilidade das emulsões formadas com Yansan e com os hidrocarbonetos aromáticos foi equivalente à estabilidade obtida com os hidrocarbonetos alifáticos. Pode-se observar também na Tabela 7.4 que a estabilidade das emulsões de hidrocarbonetos sem emulsionantes é baixa, o que mostra a importância dos agentes emulsionantes.

Emulsões formadas com Yansan e perfluorocarbonetos foram avaliadas, como mostra a Tabela 7.5 .

Tabela 7.5. Atividade emulsionante e estabilidade das emulsões formadas com perfluorocarbonetos e o Yansan e estabilidade das emulsões sem Yansan.

Fase Orgânica	Atividade emulsionante (U)	Constante de decaimento K_d (10^{-3})		Diferença
		Sem Yansan	Com Yansan	
Perfluorooctano	1,82	-2,5	-0,6	1,9
Perfluorononano	1,54	-3,7	-0,5	3,2
Perfluorodecalina	1,15	-1,3	-0,8	0,5
Perfluorotolueno	0,44	-1,2	-6,9	-5,7
Hexafluorobenzeno	1,68	-2,7	-2,4	0,3

As atividades emulsionantes obtidas para com perfluorocarbonetos e Yansan são equivalentes às reportadas para os alcanos, com exceção da emulsão com perfluorotolueno que apresentou atividade emulsionante, relativamente, baixa. De uma forma geral, a adição de Yansan foi benéfica para a estabilidade das emulsões formadas com perfluorocarbonetos.

7.4.2. Mecanismos de Envelhecimento de Emulsões formadas com Yansan

A estabilidade de emulsões pode ser avaliada também através da evolução das do tamanho das gotas e sua distribuição de tamanhos. O aumento do diâmetro da micela

é indicativo de perda de estabilidade de emulsões e a taxa de crescimento das micelas indica o mecanismo responsável pelo envelhecimento. Dois mecanismos principais têm sido propostos para a perda de estabilidade de emulsões: coagulação seguida de coalescência e difusão molecular (SJOBLOM, 1996).

A coalescência resulta da formação de micelas maiores através da união com micelas menores. Segundo a teoria de VAN DEN TEMPEL (1953), na coalescência, o volume da micela, $\overline{a}^3$, aumenta exponencialmente com o tempo, *t*, a partir de um raio médio inicial, $\overline{a_0}$, como descrito na Eq. (7.1):

$$\overline{a}^3 = \overline{a}_0^3 \exp(Kt) \tag{7.1}$$

onde *K* é a constante de coalescência.

A difusão molecular ou mecanismo *Ostwald ripening* é caracterizado pelo crescimento linear do volume das micelas com o tempo sem nenhum contato entre partículas individuais. A difusão molecular é uma conseqüência direta do efeito Kelvin, onde moléculas individuais tendem a sair de pequenas partículas e difundir através da fase contínua, entrando em micelas maiores. O tratamento teórico conhecido como a teoria *Lifshitz-Slyozov-Wagner* (LSW) (TAYLOR, 1995) estabelece que a difusão molecular pode ser caracterizada pela seguinte Eq. (7.2):

$$\frac{\partial(\overline{a}^3)}{\partial t} = \frac{8CD\gamma V_m^2}{9RT} \tag{7.2}$$

onde *C* e *D* são a solubilidade e o coeficiente de difusão, respectivamente, da fase dispersa no meio contínuo, γ é a tensão interfacial entre a fase dispersa e a fase contínua, V_m é o volume molar da fase dispersa, *R* é a constante dos gases e *T* a temperatura absoluta.

Portanto, se a evolução do tamanho das micelas segue um perfil exponencial, pode-se dizer que a emulsão perde estabilidade por coalescência, podendo-se obter o coeficiente de coalescência pelo ajuste dos pontos experimentais. Por outro lado, se a evolução do tamanho das micelas segue um perfil linear, diz-se que a emulsão perde estabilidade por difusão molecular, que é uma forma mais lenta de perda de estabilidade.

A Figura 7.7 e a Figura 7.8 mostram que a o tamanho inicial das micelas é independente do surfactante utilizado. Em pH 3 e 7 as emulsões com goma arábica

sempre tendem a perder estabilidade por coalescência. Para as emulsões com Yansan dois mecanismos forma identificados: coalescência para emulsões preparadas em pH 3 e difusão molecular para emulsões preparadas em pH 7.

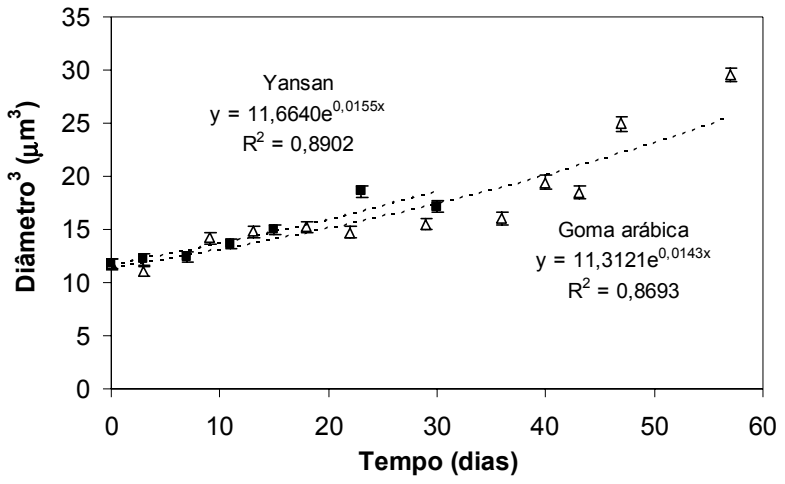

Figura 7.7. Evolução do diâmetro das micelas em função do tempo para emulsões com *n*-hexadecano em tampão pH 3 e Yansan (■) ou Goma arábica (Δ). As linhas tracejadas representam o mecanismo de coalescência.

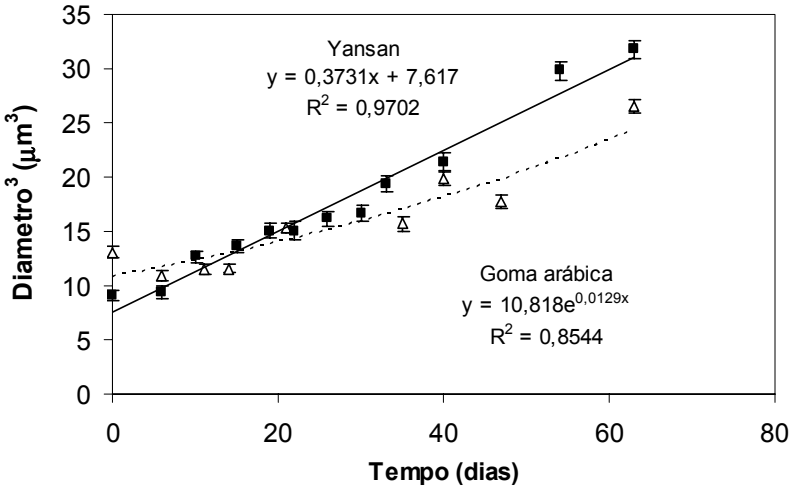

Figura 7.8. Evolução do diâmetro das micelas em função do tempo para emulsões com *n*-hexadecano em tampão pH 7 e Yansan (■) ou Goma arábica (Δ). A linha tracejada representa o mecanismo de coalescência e a linha contínua representa o mecanismo de difusão molecular.

Em pH 7, as micelas compostas por Yansan têm carga de superfície considerável, como mostrado nos resultados de potencial zeta (Figura 7.3) e não podem ficar suficientemente próximas. É, portanto, mais fácil para as moléculas individuais da fase orgânica deixar as micelas menores e se difundirem através da fase contínua para se

integrarem a micelas maiores. A goma arábica apresenta carga negativa em sua superfície a partir de pH 1,0, mas seu valor é inferior a -20 mV, sendo muito menos negativa que a carga do Yansan. Portanto, a interface da goma arábica não é suficientemente carregada para evitar a união das micelas na faixa de pH estudado e as emulsões contendo goma arábica perdem estabilidade por coalescência. Todas as emulsões estudadas perdem estabilidade por coalescência em pH 3, provavelmente devido ao fato de nessa condição, a superfície dos emulsionantes estarem próximas ao PI, indicando que a carga da superfície das micelas é baixa e as mesmas podem se aproximar e coalescer.

A influência da concentração de hexadecano nas emulsões formuladas com Yansan foi estudada com 15% (p/v) e 30% (p/v) de fase orgânica em pH 7 e a Figura 7.9 apresenta os resultados.

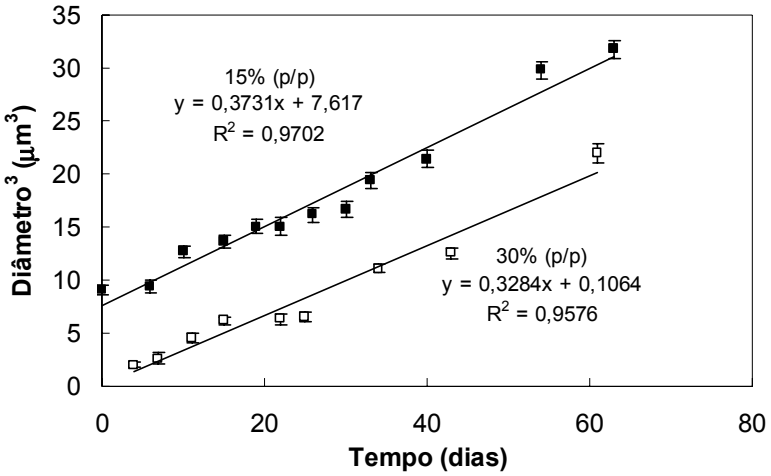

Figura 7.9. Evolução do diâmetro das micelas em função do tempo para emulsões em tampão pH 7 com Yansan e *n*-hexadecano na concentração de 15% (p/p) (■) ou 30% (p/p) (□). A linha contínua representa o mecanismo de difusão molecular.

É possível observar que o mecanismo de estabilidade das emulsões não foi afetado pela concentração de hexadecano. Houve apenas um aumento na taxa de crescimento do mecanismo de *Otwald ripening*, que é diretamente proporcional à concentração do hidrocarboneto.

7.5. Conclusões Parciais do Capítulo 7

A produção de atividade emulsionante no meio de cultivo de *Y. lipolytica* em meio YPD* independe da presença de PFC, mas aumenta com o aumento da agitação do sistema.

Um novo bioemulsionante produzido por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 foi isolado com sucesso de um meio de cultivo contendo glicose como fonte de carbono e caracterizado. Yansan é um complexo lipídio-carboidrato-proteico com alta atividade emulsionante e estabilidade em uma larga faixa de pH (3-9) e apresenta habilidade em formar emulsões com hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos e com perfluorocarbonetos.

A alta atividade emulsionante das emulsões formadas com hidrocarbonetos e com o Yansan, especialmente com os aromáticos, demonstra o potencial de utilização desse novo bioemulsionante na remediação de solos ou águas contaminadas com petróleo. A aplicação de emulsões com perfluorocarbonetos em campos biomédicos e biotecnológicos, como, por exemplo, como substitutos artificiais de sangue, aumentou a procura por surfactantes não-tóxicos (FREIRE *et al.*, 2005). Como o Yansan mostrou habilidade de emulsionar tais compostos, e sendo produzido por uma levedura não-patogênica, pode ser considerado um excelente candidato para tais usos.

O mecanismo de estabilização das emulsões formuladas com Yansan é dependente do pH para um período de análise de 60 dias. As emulsões com Yansan perdem estabilidade por coalescência em pH 3 e por difusão molecular em pH 7, indicando que o pH é um dos fatores responsáveis pela estabilidade destas emulsões devido à alta carga de sua superfície.

Além das potenciais aplicações, os resultados apresentados mostram que as interações entre as células de *Y. lipolytica* e a perfluorodecalina nos cultivos de produção de lipase possivelmente são intermediadas por um agente emulsionante produzido pela própria levedura, que forma emulsões estáveis entre a fase aquosa e o PFC.

8. ESTUDO DA CAPACIDADE DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO DE UM BIORREATOR MULTIFÁSICO

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, k_La, é uma dos parâmetros mais importantes em bioprocessos aeróbios e depende em diferentes fatores, como as características geométricas e operacionais dos vasos reacionais, da composição do meio de cultivo, do tipo, concentração e morfologia dos microrganismos (GALACTION *et al.*, 2004). Geralmente, assume-se que esse parâmetro depende da potência de agitação por unidade de volume (P/V) ou da velocidade de agitação do impelidor (HASSAN e ROBINSON, 1977). O aumento de escala de muitos processos é baseado em correlações de vários tipos para prever o k_La para uma dada geometria de vaso reacional. Na presença de uma única interface, gás-líquido, a quantidade de oxigênio transferido depende do valor de k_La e da diferença entre a concentração de oxigênio dissolvido e sua saturação. A introdução de uma fase líquida imiscível, como o PFC, torna o sistema mais complexo do ponto de vista de transferência de oxigênio. É necessário, portanto, um estudo avaliando os efeitos de vários parâmetros de projeto nos valores globais de k_La.

Resultados preliminares em frascos agitados (Capítulo 5) mostraram que a utilização de um composto carreador de oxigênio no meio de cultivo de *Y. lipolytica* aumentou a produção de lipase. Portanto, medidas de k_La em um biorreator de 2 L agitado e aerado foram realizadas para se identificar as condições operacionais ótimas para o cultivo de um microrganismo dependente de oxigênio, *Y. lipolytica*, na presença de uma segunda fase líquida imiscível, perfluorodecalina.

Como nessa parte do trabalho não se utilizou outro tipo de perfluorocarboneto, o termo PFC será utilizado para a perluorodecalina nesse Capítulo e no seguinte.

8.1. A Influência do Volume Útil de Líquido

O volume útil de líquido utilizado nas fermentações é um parâmetro importante, pois volumes muito grandes podem dificultar a aeração devido a menor razão entre a superfície de contato com o ar e o volume de meio ou pode melhorar devido ao maior tempo de residência das bolhas de ar no meio quando o difusor de ar se encontra na base do reator. Deve-se levar em conta que quanto maior o volume útil, maior a quantidade de extrato produzido.

Para determinar a influência do volume útil de meio na taxa de transferência de oxigênio, dois volumes de água destilada foram testados, 1,0 e 1,5 L, sob agitação de 250 rpm, utilizando os impelidores do tipo *A* (turbina tipo *Rushton* com pás retas verticais) e taxa de aeração (*Q*) variando de 0,5 a 2,0 L min^{-1}. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 8.1 e pode-se observar que para valores de taxa de aeração maiores que 1,0 L min^{-1}, não há diferenças significativas nos valores de k_La obtidos para os diferentes volumes estudados.

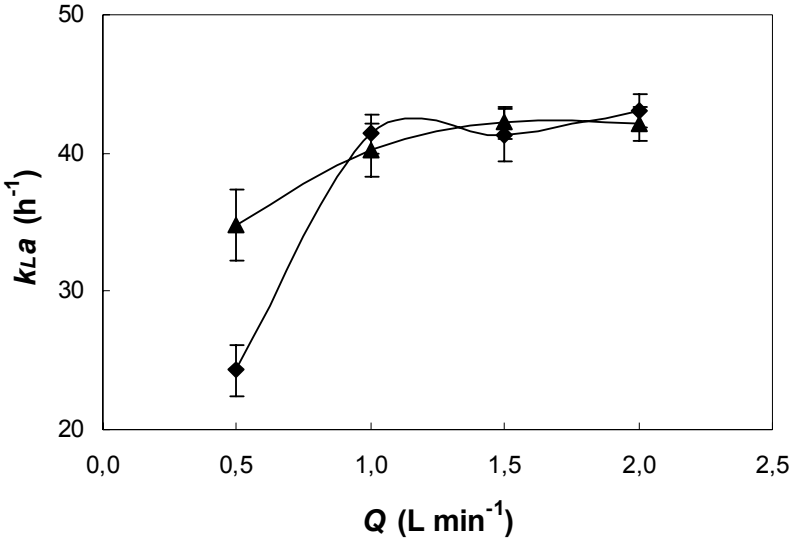

Figura 8.1. Influência do volume útil de líquido nos valores de k_La utilizando água destilada, sob agitação de 250 rpm, com o impelidor do tipo *A* (turbina tipo *Rushton* com pás retas verticais), em função da taxa de aeração. Volume útil: (♦) 1,0 L; (▲) 1,5 L. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de replicatas.

A Figura 8.1 mostra que há redução na capacidade de transferência de oxigênio quando se aumenta o volume de água quando a taxa de aeração é baixa (0,5 L min^{-1}), que pode ser devido ao maior tempo de residência das bolhas de ar com o volume maior. Portanto, baseando-se nos resultados obtidos, o volume de 1,5 L foi escolhido para os estudos subseqüentes.

8.2. A Influência da Posição dos Impelidores

O PFC (perfluorodecalina) é mais denso que a água e, portanto, fica no fundo do reator quando não se aplica agitação no sistema. Foi observado durante as medidas que, na faixa de agitação estudada, o PFC não era completamente disperso na fase aquosa. Dessa forma, posições diferentes para o impelidor do tipo *B* (Turbina tipo *Pitched Blade*

(Fluxo axial) com seis lâminas) foram testadas (modificando h_1 e h_2), com a fração volumétrica (Φ) de PFC de 0,20 para se investigar sua influência na dispersão do PFC e, conseqüentemente, nos valores de k_La. A Figura 8.2 apresenta os resultados obtidos.

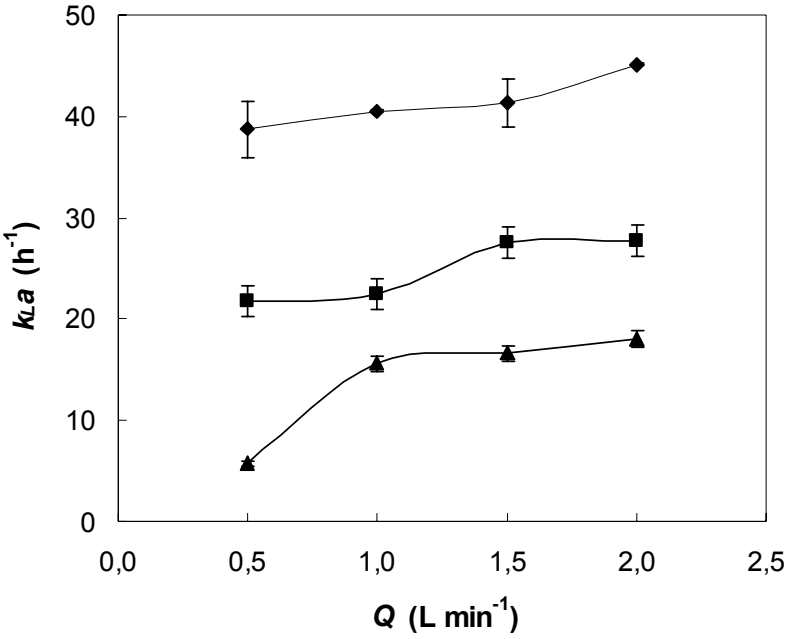

Figura 8.2. Influência da posição dos agitadores nos valores de k_La no sistema com água e 20% (v/v) de PFC, sob agitação de 250 rpm, com impelidores do tipo *B*, em função da taxa de aeração: (♦) Posição 1: h_1 = 3,5 cm, h_2 = 3,0 cm; (▲) Posição 2: h_1 = 6,5 cm, h_2 = 1,0 cm; (■) Posição 3: h_1 = 3,5 cm, h_2 = 1,0 cm. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de replicatas.

É possível observar na Figura 8.2, que a Posição 1, foi a melhor posição para os agitadores fornecendo maiores valores de k_La. Esta posição leva a um aumento de 3,6 e 1,7 vezes nos valores de k_La em comparação com as Posições 2 e 3, respectivamente. Aparentemente as Posições 2 e 3 dispersaram melhor o PFC, entretanto, os valores de k_La menores se devem ao fato de que nessas posições o agitador mais baixo ficava muito próximo da saída de ar, interrompendo o caminho das bolhas. Os estudos seguintes forma realizados com os impelidores na Posição 1.

8.3. A Influência do Tipo de Impelidor

Vários tipos de impelidores são utilizados em biorreatores. Para avaliar seus efeitos na taxa de transferência de oxigênio do biorreator, três tipos de impelidores foram testados utilizando água destilada como meio líquido. A Figura 8.3 apresenta os resultados obtidos, mostrando que o impelidor que promove maiores valores de k_La é o

tipo *A* (Turbina tipo *Rushton* com seis lâminas verticais) para a maioria das condições testadas.

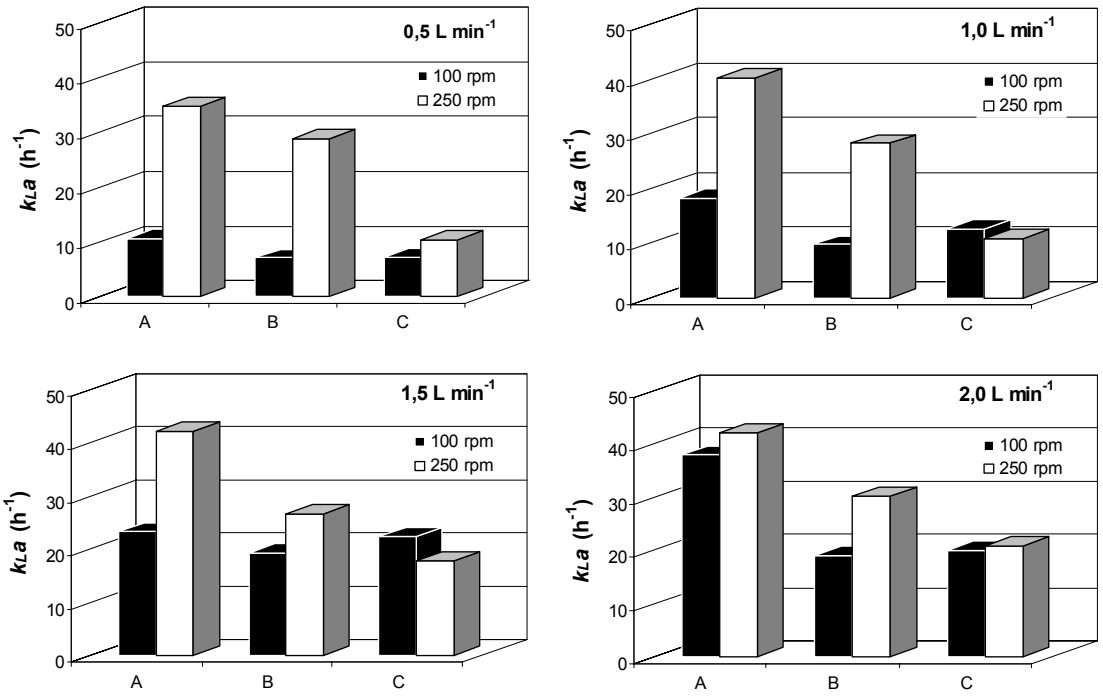

Figura 8.3. Influência do tipo de impelidor nos valores de k_La utilizando água destilada sob agitação de 100 e 250 rpm e taxa de aeração variando de 0,5 to 2,0 L·min^{-1}. Impelidores: *A*: **Turbina tipo *Rushton* com seis lâminas verticais;** *B*: **Turbina tipo *Pitched Blade* (Fluxo axial) com seis lâminas;** *C*: **tipo *Marine propeller* com 3 lâminas).**

O impelidor do tipo *A* apresentou, em média, um aumento de 1,5 e 2,2 vezes nos valores de k_La em relação aos impelidores tipo *B* e *C*, respectivamente. Esse impelidor é mais eficiente para quebrar as bolhas de ar devido a sua maior área de seção transversal e, conseqüentemente, isso aumenta a área superficial das bolhas, aumentando a taxa de transferência de oxigênio. No entanto, quando a agitação do sistema é mais baixa (100 rpm), os valores de k_La não apresentam diferenças tão significativas para os tipos de agitadores testados, exceto para maior aeração (2 L min^{-1}).

A Figura 8.3 também mostra que para todos os casos a agitação foi mais eficiente para aumentar o k_La do que a aeração. CHEN *et al.* (1999) mostraram que a produtividade da lipase depende mais da agitação do que da aeração, provavelmente devido a maior influência da agitação na transferência de oxigênio, que é, em muitos casos, essencial para a produção de lipase.

8.4. A Influência da Concentração de PFC

Além dos estudos de k_La em água destilada pura, a influência dos três tipos de impelidores na transferência de oxigênio foi também avaliada no meio multifásico, ou seja, com adição de diferentes frações volumétricas de PFC (de 0 a 0,30) em água destilada, variando-se a agitação e a aeração dos sistemas.

É possível ter uma visão geral da influência dos três tipos de impelidores na transferência de oxigênio em meio multifásico, além da influência da concentração de PFC, observando a Figura 8.4.

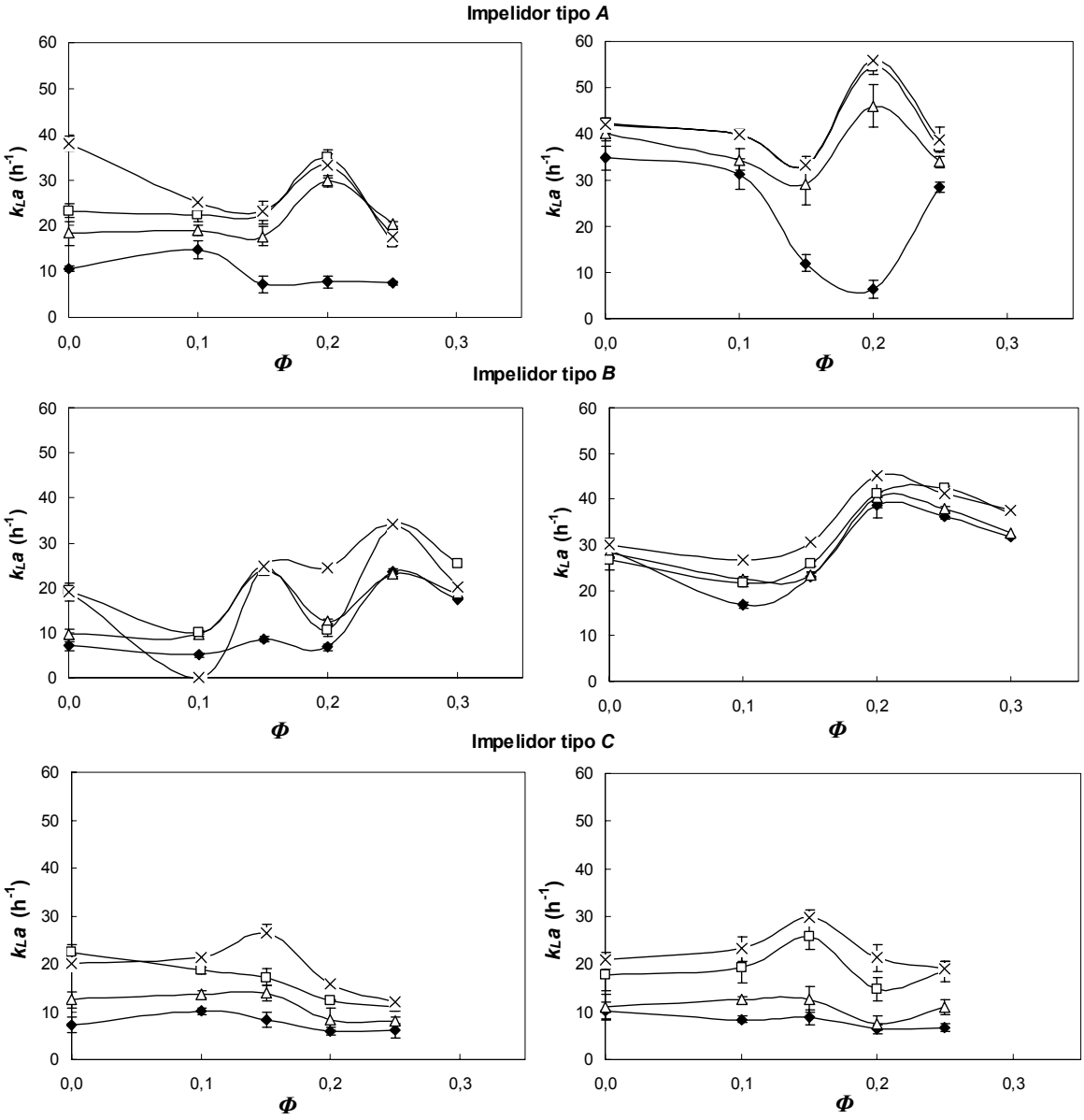

Figura 8.4. Influência da fração volumétrica de PFC (*Φ*) nos valores de k_La em água destilada, utilizando três tipos de impelidores diferentes (*A*: Turbina tipo *Rushton* com seis lâminas verticais;

_B_: Turbina tipo _Pitched Blade_ (Fluxo axial) com seis lâminas; _C_: tipo _Marine propeller_ com 3 lâminas), variando-se a agitação (100 e 250 rpm) e a taxa de aeração, L min^{-1}: (♦) 0,5; (Δ) 1,0; (□) 1,5; (×) 2,0. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de replicatas.

Para os impelidores do tipo *A*, nas duas velocidades de agitação estudadas, e com taxa de aeração acima de 1,0 L min^{-1}, o k_La é máximo para fração volumétrica de PFC em 0,2. Para os impelidores do tipo *B*, a concentração de PFC ótima para o aumento de k_La depende da velocidade de agitação do sistema. Quando o sistema é agitado a 250 rpm, a fração volumétrica ótima de PFC é 0,20, enquanto que para a agitação mais baixa, a fração volumétrica ótima de PFC aumenta para 0,25.

Através dos resultados apresentados na Figura 8.4 é possível observar que os valores de k_La em sistema multifásico dependem da agitação e, em menor grau, da aeração do sistema, além da capacidade dos impelidores em dispersar adequadamente não apenas as bolhas de ar como também o PFC na fase aquosa. Os impelidores do tipo *C* foram os mais ineficientes para o aumento da transferência de oxigênio, obtendo-se valores de k_La mais baixos e ainda esses valores pareceram depender mais da taxa de aeração do que quando se utilizou os outros tipos de impelidores. Esse tipo de impelidor apresenta uma eficiência máxima quando a fração volumétrica de PFC é 0,15, sendo, nesse caso, a aeração o fator mais importante na dispersão do PFC.

Da mesma forma do que foi observado para água pura, em meio multifásico, o impelidor do tipo *A* foi mais eficiente no aumento de k_La com um aumento de 1,2 e 1,9 vezes em relação aos impelidores *B* e *C*, respectivamente, em seus valores ótimos de k_La. Para todos os impelidores testados o k_La obtido foi maior com o aumento da agitação do sistema (independente da concentração de PFC) pois a intensificação da agitação induz a dispersão das bolhas de ar e das gotas de PFC com o aumento da área interfacial.

Portanto, foi mostrado que a perfluorodecalina é benéfica para a transferência de oxigênio do sistema, atingindo um máximo no valor de k_La em uma dada concentração de PFC após a qual, observa-se a redução desse valor. A presença de um carreador de oxigênio facilita a transferência deste gás para a fase aquosa, mas a partir de uma determinada concentração o comportamento reológico do meio começa a ser crítico. Em elevadas concentrações de PFC a viscosidade do meio aumenta muito, diminuindo a taxa de transferência de oxigênio. O pico no valor de k_La observado é, portanto, o resultado da influência competitiva entre um aumento na transferência de oxigênio, resultante da ação das gotas de PFC como intermediárias na transferência de oxigênio, e a inibição da transferência de oxigênio devido ao aumento da viscosidade do líquido com o aumento da concentração de PFC.

Vários autores reportam na literatura a dependência do k_La em diferentes sistemas com a concentração de uma segunda fase líquida imiscível com a fase aquosa (DUMONT *et al.*, 2006; ELIBOL, 1999; ELIBOL e MAVITUNA, 1997; ELIBOL e MAVITUNA, 1999). Obviamente os valores de k_La dependem da faixa de concentração de estudada, do tipo de biorreator empregado e das condições geométricas do equipamento. DUMONT *et al.* (2006) observaram que a adição da fase orgânica não influenciou significativamente o k_La do sistema, mas, nesse caso, o estudo foi limitado em 4% (v/v) de fase orgânica. Por outro lado, ELIBOL e MAVITUNA (1997; 1999) encontraram um máximo nos valores de k_La com a adição de 20% (v/v) de perfluorodecalina em um biorretor de 20 L. ROLS *et al.* (1990) encontraram um máximo no valor de k_La com concentração de 23% (v/v) de hidrocarboneto ou perfluorocarboneto, observando que o aumento da concentração da fase orgânica aumenta a viscosidade do meio.

8.5. A Influência da Fase Aquosa

Soluções contendo eletrólitos inorgânicos inibem a coalescência tanto das bolhas de ar quanto das gotas de óleo, o que afeta o k_La dos sistemas (HASSAN e ROBINSON, 1977). O efeito da utilização do meio YPD ao invés de água destilada nos valores de k_La foi avaliado utilizando duas frações volumétricas de PFC, como mostra a Tabela 8.1.

Tabela 8.1. Influência da fração volumétrica (Φ) de PFC nos valores de k_La, comparando as diferentes fases aquosas: meio YPD e água, utilizando impelidores do tipo *A*. O desvio padrão variou de 3 a 15%.

Φ de PFC	Aeração (L min^{-1})	k_La (h^{-1})			
		100 rpm		250 rpm	
		Água	Meio YPD	Água	Meio YPD
0,00	1,0	18,3	13,8	40,2	19,7
	1,5	23,2	16,5	42,2	19,1
	2,0	37,2	20,6	42,1	19,7
0,15	1,0	17,7	12,7	28,9	31,2
	1,5	22,4	22,4	33,3	34,0
	2,0	23,3	29,5	33,2	34,9
0,20	1,0	29,8	26,9	46,0	43,9
	1,5	34,9	44,0	54,6	46,5
	2,0	33,1	47,4	55,8	64,6

A Tabela 8.1 mostra que na ausência de PFC, ocorre uma redução nos valores de k_La quando o meio YPD é utilizado em comparação com a água. Na presença de PFC, a

tendência dos valores de k_La é similar para o meio YPD ou para a água, obtendo-se maiores valores de k_La com fração volumétrica de PFC de 0,20, embora a magnitude do efeito do PFC seja diferente nas fases aquosas estudadas. O maior aumento de k_La obtido em água com a adição de PFC foi de 24,5% para a agitação de 250 rpm com taxa de aeração de 2,0 L min^{-1}. Para essa mesma condição em meio YPD, a adição de 20% (v/v) de PFC promove uma aumento de 227,9%.

O meio YPD é composto de peptona de caseína que tem uma pequena capacidade emulsionante e, portanto, pode dispersar mais eficientemente as gotas de PFC pela fase aquosa, fornecendo menores gotas de PFC e maior área interfacial. FREIRE *et al*. (2005) estudaram a capacidade emulsionante do meio YPD, preparando uma suspensão com 50% (p/v) de PFC em meio YPD sonicada por 2 minutos e obtiveram uma emulsão estável por 48 horas com tamanho médio de partículas de 0,36 μm.

8.6. A Influência da Fase Orgânica

O óleo de oliva é freqüentemente utilizado como indutor para produção de lipase (PEREIRA-MEIRELLES *et al*., 1997) e também apresenta alta solubilidade de oxigênio (BATTINO *et al*., 1983). Assim sendo, a utilização dessa fase orgânica para, simultaneamente, induzir a produção de lipase e aumentar a transferência de oxigênio seria uma opção a se considerar em substituição do PFC. Os valores de k_La medidos para diferentes frações volumétricas de óleo de oliva no biorreator, utilizando água como fase aquosa, são apresentados na Figura 8.5.

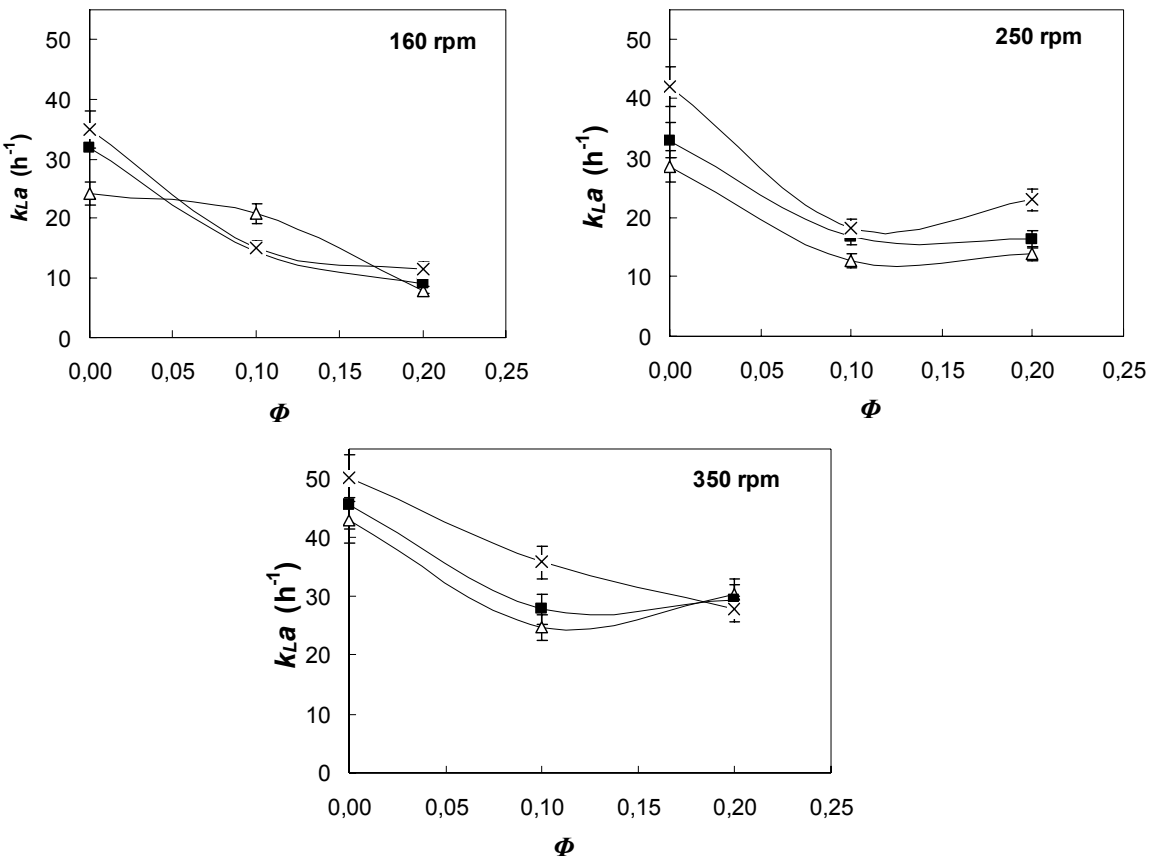

Figura 8.5. Influência da fração volumétrica de oleo de oliva (*Φ*) nos valores de k_La obtidos em água, com impelidores do tipo *A*, variando-se a velocidade de agitação (160 a 350 rpm) e a taxa de aeração, L min^{-1}: (▲) 1.0; (■) 1.5; (×) 2.0. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de replicatas.

Ao contrário do que foi observado com PFC, a presença do óleo de oliva causou uma redução no k_La do sistema em todas as concentrações estudadas. O óleo de oliva é mais viscoso que o PFC utilizado e menos denso que a água, ficando no topo da fase líquida. Essa situação faz com que a dispersão da segunda fase seja mais difícil, o que requer velocidades de agitação bastante altas para dispersar a fase orgânica. Além disso, a elevada viscosidade do óleo de oliva leva a baixos coeficientes de difusão para o oxigênio na fase orgânica e, portanto, baixa permeabilidade que podem também contribuir para a redução do k_La, como foi observado.

Os diferentes efeitos observados nos valores de k_La pelas fases orgânicas podem ser explicados pelas propriedades interfaciais dos sistemas em termos de coeficiente de espalhamento (S_{OW}) que descreve a tendência da fase orgânica em se espalhar na interface ar-água e é definido pela Eq. (8.1) (AVEYARD e HAYDON, 1973):

$$S_{OW} = \gamma_{WG} - (\gamma_{OG} + \gamma_{OW}) \qquad (8.1)$$

onde γ é a tensão interfacial e os subscritos *OW*, *WG* e *OG* referem-se a interfaces fase orgânica-água, água-gás e fase orgânica-gás.

Esse modelo descreve a distribuição das fases orgânica e contínua próximo a interface gás-líquido. Para dispersões com um valor positivo para o coeficiente de espalhamento, o papel da transferência de massa direta entre o gás e a fase orgânica é, provavelmente mais importante, já que essas dispersões têm uma tendência a se espalharem como um filme na interface entre a água e o gás. Por outro lado, dispersões com um coeficiente de espalhamento negativo têm a tendência de permanecerem dispersos como gotas discretas de tal forma que o contato direto entre o gás e a fase orgânica não ocorre.

Medidas de tensão superficial realizadas a 29ºC, reportadas na Tabela 8.2, permitiram o cálculo do coeficiente de espalhamento, S_{OW}, para perfluorodecalina e óleo de oliva, que são, respectivamente, -5,5 and 24,9 $mN.m^{-1}$. Um coeficiente de espalhamento negativo para perfluorodecalina também foi encontrado por RIESS (2005).

Tabela 8.2. Medidas de tensão superficial para água e água com perfluorodecalina ou óleo de oliva realizadas a 29ºC. Medida realizada em um tensiômetro NIMA DST 9005 da empresa *NIMA Technology, Ltd.* pelo aluno Pedro J. Carvalho, no laboratório CEFASI da Universidade de Aveiro (Portugal).

Interface	γ ($mN\ m^{-1}$)
Ar – água	71,35 ± 0,03
Ar – Perfluorodecalina	18,99 ± 0,01
Ar – Óleo de oliva	32,13 ± 0,02
Perfluorodecalina – Água	57,80 ± 0,30
Óleo de oliva – água	14,31 ± 0,05

Portanto, o aumento da taxa de transferência de oxigênio promovido pela adição de PFC não é devido a um comportamento de espalhamento, mas sim pelo alto coeficiente de difusão e alta solubilidade do oxigênio na fase dispersa (PFC), onde as gotas da fase dispersa carregam o oxigênio da interface gás-líquido para o seio da fase contínua (água ou fase aquosa), conhecido como "*shuttle mechanism*" (DUMONT e DELMAS, 2003). No caso do óleo de oliva, ocorre um aumento na área interfacial, devido ao espalhamento do óleo de oliva sobre as bolhas de ar, que reduz a tensão interfacial gás-líquido. No enatnto, o baixo coeficiente de difusão do oxigênio em óleo de oliva não permite a tranferênicia do oxigênio para o seio da fase líquida.

8.7. A Influência das Células de *Y. lipolytica*

A influência de células na taxa de transferência de oxigênio resulta do aumento da viscosidade aparente do meio devido ao acúmulo de biomassa, a redução da solubilidade de oxigênio e o efeito bloqueador criado pela adsorção das células na superfície das bolhas de ar (CASCAVAL *et al.*, 2006).

A influência das células inativas de *Y. lipolytica* nos valores de k_La do sistema foi investigada em diferentes velocidades de agitação e taxas de aeração, variando-se a concentração de PFC. A Figura 8.6 apresenta os valores de k_La obtidos para os sistemas sem células e na presença de 5 e 10 g de peso seco de células por L, que é a faixa de concentração celular observada para o cultivo de *Y. lipolytica* em meio YPD para produção de lipase (Capítulo 5).

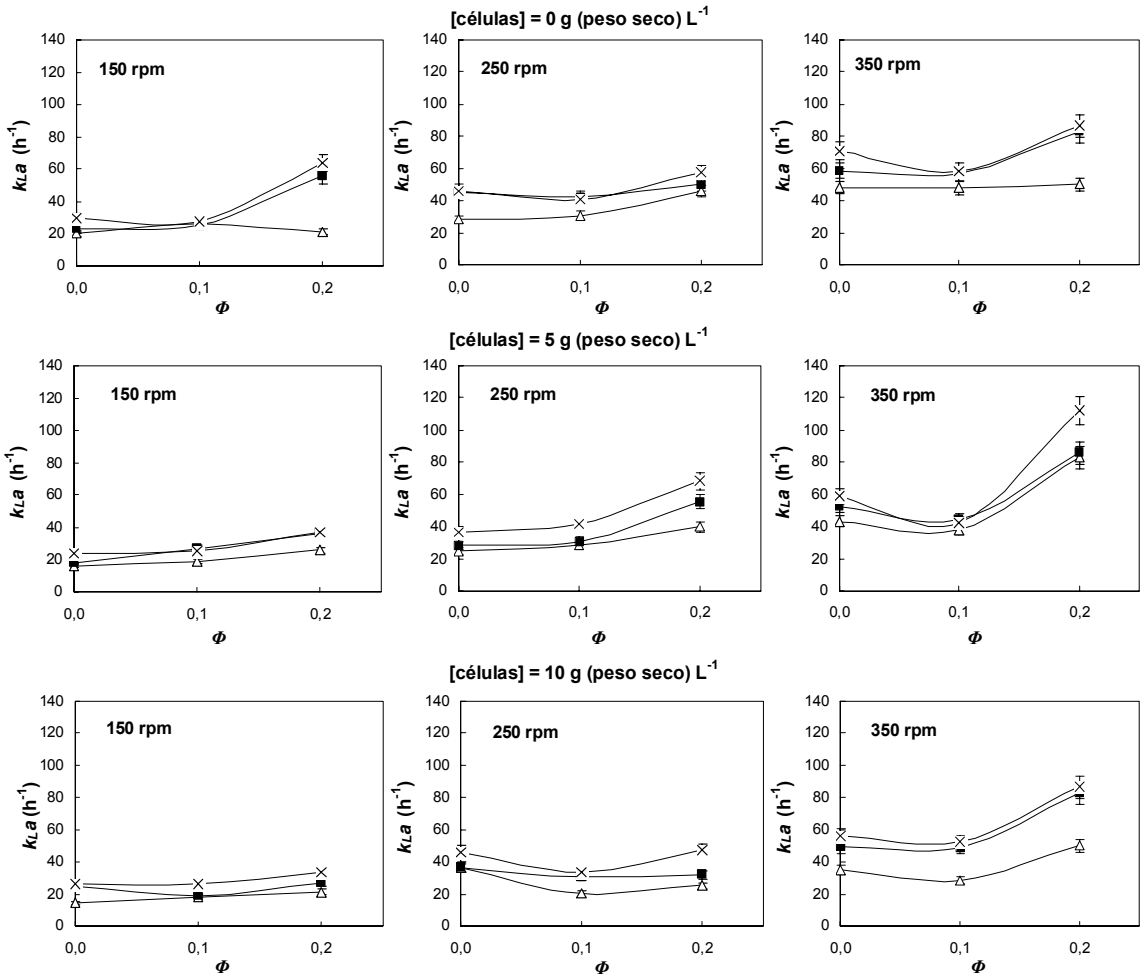

Figura 8.6. Influência da fração volumétrica de PFC(Φ) nos valores de k_La com meio YPD, na ausência e presença de duas concentrações de células inativas de *Y. lipolytica*, com impelidores do tipo *A*, variando-se a velocidade de agitação (160 a 350 rpm) e a taxa de aeração, L·min^{-1}: (▲) 1,0; (■) 1,5; (×) 2,0. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de replicatas.

Os resultados mostram uma pequena redução do k_La com o aumento da concentração celular, em alguns casos. A redução nos valores de k_La é sutil, provavelmente devido ao fato de que as concentrações celulares utilizadas não são muito altas. Partículas com diâmetro maior que a camada limite de transferência de massa podem aumentar a absorção de gases, mas o aumento diminui com o aumento do diâmetro da partícula (GALACTION *et al.*, 2004). As células de *Y. lipolytica* inativas apresentam um diâmetro médio de 7 μm, e, portanto, tendem a reduzir a transferência de oxigênio. É possível notar na Figura 8.6 que o aumento da aeração, de uma forma geral, não influenciou muito no aumento do k_La, principalmente de 1,5 para 2,0 L min^{-1}.

Pode-se observar também na Figura 8.6 que o efeito benéfico do PFC na presença das células só é significativo com a maior velocidade de agitação. CASCAVAL *et al.* (2006) mostraram a redução do efeito favorável da adição de um vetor de oxigênio devido à adsorção das células nas gotas do hidrocarboneto dada a característica hidrofóbica da bactéria utilizada. Como foi visto no Capítulo 6, a superfície das células de *Y. lipolytica* IMUFRJ apresenta alta afinidade por compostos orgânicos, o que pode estar levando à adesão e ao efeito bloqueador das células no PFC, reduzindo a transferência de oxigênio. No entanto, quando a velocidade de agitação aumenta, as gotas de PFC se tornam menores e o efeito bloqueador das células diminui, permitindo que o PFC transfira oxigênio eficientemente, como pode-se observar na Tabela 8.3. O aumento no valor de k_La pela adição de uma fração volumétrica de 0,20 de PFC, em comparação com o controle (sem PFC) para todas as condições de aeração é maior na presença de células. Portanto, o aumento da viscosidade pela presença de células ou o efeito bloqueador das células são fatores desprezíveis quando a velocidade de agitação do sistema é alta.

Tabela 8.3. Efeito da presença de 20% (v/v) de PFC nos valores de k_La na presença e ausência de células quando o sistema é agitado a 350 rpm, variando-se a taxa de aeração.

Aumento no valor de k_La ($k_La_{(20\%PFC)}$/ $k_La_{(0\%PFC)}$)			
Conc. de células (g (peso seco) L^{-1})	**Aeração (L min^{-1})**		
	1,0	**1,5**	**2,0**
0	1,04	1,41	1,22
5	1,91	1,62	1,91
10	1,43	1,68	1,55

8.8. Correlação para o Coeficiente de Transferência de Massa

Com a finalidade de se prever o desempenho da fermentação utilizando modelos que levam em consideração o efeito do oxigênio dissolvido, uma correlação empírica foi desenvolvida para a transferência de oxigênio em biorreator multifásico. Correlações que consideram a presença de uma fase líquida imiscível com a água (HANSSAN e ROBINSON, 1977; NIELSEN *et al.*, 2003) ou a presença de células microbianas (CASCAVAL *et al.*, 2006; GALACTION *et al.*, 2004; GALACTION *et al.*, 2005) já foram propostas. Geralmente estas correlações foram desenvolvidas para hidrocarbonetos, como fase orgânica, enquanto que no presente trabalho a correlação desenvolvida foi desenvolvida para um perfluorocarboneto, a perfluorodecalina, na presença de células inativas.

A potência específica consumida é um parâmetro que indica o grau de turbulência e a circulação de meio no biorreator. Para sistemas sem aeração com um agitador do tipo *Rusthon turbine*, utiliza-se para o cálculo da potência consumida para a agitação, o número de potência, N_p (GALACTION *et al.*, 2005):

$$N_p = \frac{P}{\rho N^3 d^5} = \frac{6}{\mathrm{Re}^{0.15}} \tag{8.2}$$

sendo P a potência de agitação, sem arejamento (W), ρ a densidade do líquido (Kg m^{-3}), N a velocidade de agitação (rps), d o diâmetro do agitador (m) e Re o número de *Reynolds* de agitação.

A potência consumida para um sistema agitado mecanicamente e com aeração pode ser determinada em relação ao valor obtido para o sistema sem aeração, utilizando a Eq. (8.3) (HUGHMARK, 1980):

$$\frac{P_a}{P} = 0.10\left(\frac{gwV^{2/3}}{Nd^4}\right)^{0.2}\left(\frac{NV}{Q}\right)^{0.25} \tag{8.3}$$

sendo w a altura da lâmina do impelidor, V o volume de meio (m^3) e Q o fluxo de ar (m^3 s^{-1}).

Baseando-se nesses conceitos, uma correlação matemática que descreve a influência dos parâmetros estudados nos valores de k_La foi estabelecida. Os parâmetros

da correlação desenvolvida foram estimados utilizando o *software Excel* sendo a diferença entre os valores experimentais e os obtidos pelo modelo minimizados pelo método dos mínimos quadrados.

Como foi mostrado por NIELSEN e VILLADSEN (1994), uma correlação típica para se estimar valores de $k_L a$ é:

$$k_L a = \alpha \left(\frac{P_a}{V} \right)^{\beta} v_s^{\chi} \tag{8.4}$$

sendo α, β e χ parâmetros empíricos e v_s a velocidade superficial do ar (m s^{-1}).

De forma a se considerar a influência da concentração de células inativas e a fração volumétrica de PFC, a forma geral da equação proposta é:

$$k_L a = \alpha \left(\frac{P_a}{V} \right)^{\beta} v_s^{\chi} (1-\Phi)^{\delta} X^{\varepsilon} \tag{8.5}$$

sendo α, β, χ, δ e ε parâmetros empíricos, ϕ a fração volumétrica de PFC e X a concentração de células (g L^{-1}).

Utilizando os dados experimentais de $k_L a$ obtidos com meio YPD*, células inativas e PFC, os valores dos coeficientes α, β, χ, δ e ε foram estimados, sendo a seguinte correlação obtida:

$$k_L a = 0.153 \frac{\left(\frac{P_a}{V} \right)^{0.302} v_s^{0.699} X^{0.068}}{(1-\Phi)^{1.378}} \tag{8.6}$$

com o $k_L a$ dado em s^{-1}.

A correlação proposta apresenta uma boa concordância com os dados experimentais, com um desvio médio de ± 15,7 %, como mostra a Figura 8.7, que apresenta os valores preditos *versus* os resultados experimentais com uma linha de inclinação igual a 1. O baixo valor para o coeficiente ε (coeficiente de X) traduz a pequena dependência dos valores de concentração celular com esse parâmetro. Por outro lado, o alto valor do coeficiente negativo encontrado para (1-Φ) mostra a

influência positiva do aumento da fração volumétrica de PFC na transferência de oxigênio.

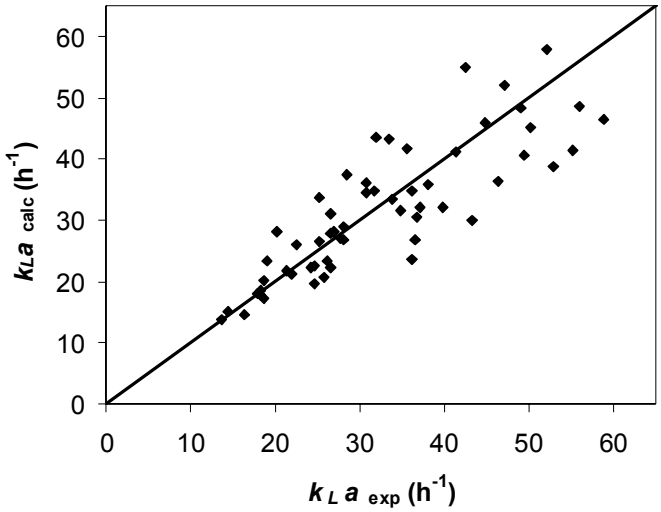

Figura 8.7. Correlação entre os valores de k_La calculados pelo modelo e os experimentais obtidos em meio YPD, com células inativas, com a adição de PFC, variando-se a velocidade de agitação (160 a 350 rpm) e a taxa de aeração (1,0 a 2,0 L min^{-1}) (k_La_{exp}, valores experimentais de k_La), (k_La_{calc}, valores de k_La calculados pelo modelo).

8.9. Conclusões Parciais do Capítulo 8

A adição de perfluorodecalina no meio aquoso (água ou meio YPD*) promove o aumento do k_La, enquanto que a adição de óleo de oliva reduz o valor desse coeficiente no reator multifásico. Os resultados obtidos com perfluorodecalina mostram que a taxa de transferência de oxigênio é influenciada tanto pela turbulência como pela viscosidade do meio, o que leva a uma fração volumétrica de PFC ótima para o k_La.

A mudança da fase aquosa de água pura para meio YPD* resultou no aumento do valor de k_La para um valor máximo de 64,6 h^{-1} com a fração volumétrica de perfluorodecalina de 0,20 e duas turbinas do tipo *Rushton* com seis lâminas verticais. O aumento em k_La obtido em água pura foi de 25%, enquanto que nas mesmas condições para meio YPD* a adição de 20% (v/v) de PFC aumentou o k_La em 230%.

A transferência de oxigênio no sistema multifásico estudado parece resultar de interações complexas e da combinação de vários fatores, como a agitação, a fração volumétrica da fase orgânica e o tipo de fase orgânica, assim como a aeração do sistema, embora em menor grau.

O aumento da taxa de transferência de oxigênio promovido pela adição de PFC é devido ao alto coeficiente de difusão e alta solubilidade do oxigênio na fase dispersa (PFC), onde as gotas da fase dispersa carregam o oxigênio da interface gás-líquido para o seio da fase contínua (água ou fase aquosa), chamado "*shuttle mechanism*".

A presença de células como partículas (inativas) apresentaram certa influência na transferência de oxigênio quando o sistema é agitado lentamente (até 250 rpm), havendo uma redução tanto do valor de k_La, como do efeito benéfico do PFC. Entretanto, com maior velocidade de agitação (a partir de 350 rpm) a interferência das células na transferência de oxigênio passa a ser positiva.

Foi estabelecida uma correlação matemática que descreve a influência dos parâmetros estudados (agitação, aeração, concentração de PFC e concentração de células) nos valores de k_La com boa concordância com os dados experimentais, com um desvio médio de ± 15,7 %.

9. PRODUÇÃO DE LIPASE DE *Y. LIPOLYTICA* EM UM BIORREATOR MULTIFÁSICO

Os resultados dos experimentos preliminares em frascos agitados (Capítulo 5) mostraram que a adição de 20% (v/v) de perfluorodecalina aumentou significativamente a produção de lipase. Além disso, os estudos de transferência de oxigênio em biorreator revelaram que essa é a concentração de PFC que promove um maior valor para o coeficiente de transferência de oxigênio (k_La), que o aumento da aeração de 1,5 para 2,0 L min^{-1} não alterou significativamente o k_La e que o efeito da adição de PFC é mais significativo quando o sistema está sob agitação maior que 250 rpm. Os resultados desta etapa também indicaram que o melhor impelidor para a transferência de oxigênio foi o tipo *A* (*Rushton turbine*) e que o volume útil de 1,5 L promovia maior k_La que um menor volume.

Assim sendo, os experimentos para produção de lipase foram realizados em biorreator de 2 L, utilizando impelidores do tipo *Rushton turbine* com 1,5 L de volume útil de meio. Nessas condições foram investigados os efeitos da agitação e da adição de 20% (v/v) de PFC no crescimento celular e na produção de lipase.

ALONSO *et al.* (2005) reportaram que o crescimento celular de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, utilizando óleo de oliva como fonte de carbono, e a produção de lipases em um biorreator de 2 L (*Multigen*), foi prejudicado com o aumento da agitação do sistema de 300 para 400 rpm. Notou-se a perda da viabilidade celular devido ao aumento do estresse cisalhante. Desta forma, no presente trabalho, inicialmente, utilizou-se a agitação máxima de 350 rpm.

9.1. Cinética de Crescimento Celular

Os experimentos foram inicialmente realizados sob agitação de 250 e 350 rpm, com e sem adição de 20% (v/v) de PFC. A Figura 9.1 e a Figura 9.2 mostram as curvas de crescimento celular e consumo de glicose, respectivamente.

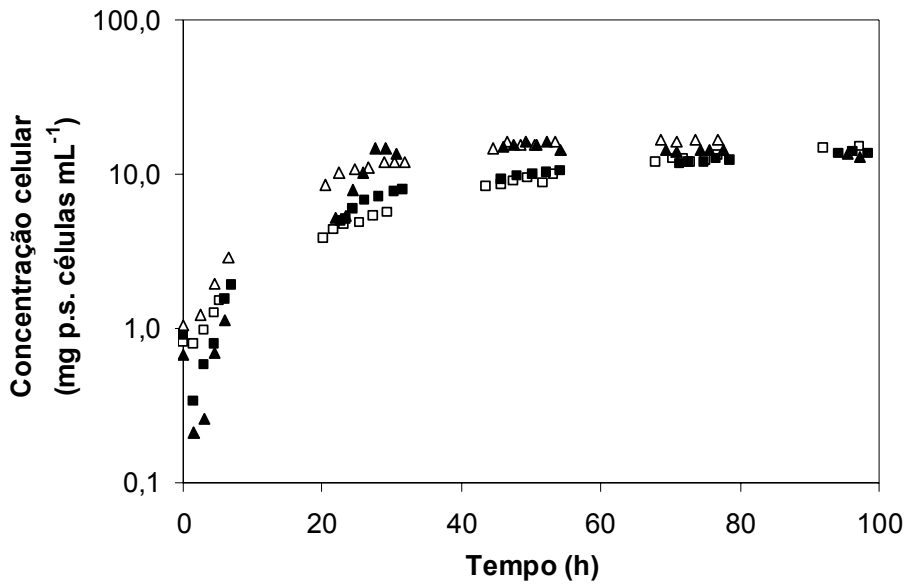

Figura 9.1. Cinética de crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L (1,5 L de volume útil de meio) em YPD*, com aeração de 1,5 L min^{-1} nas seguintes condições de agitação e concentração de PFC: (□) 250 rpm, 0% (v/v) de PFC; (■) 250 rpm, 20% (v/v) de PFC; (Δ) 350 rpm, 0% (v/v) de PFC; (▲) 350 rpm, 20% (v/v) de PFC.

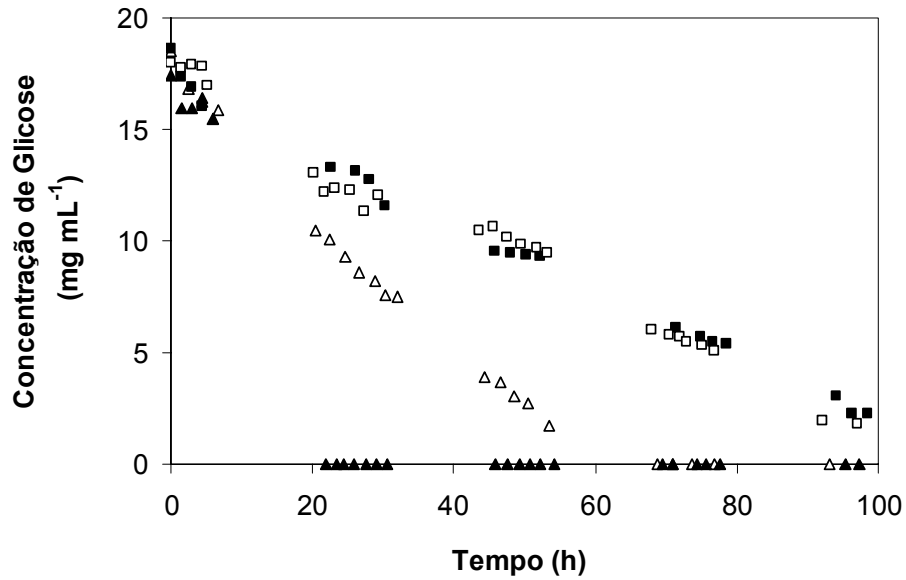

Figura 9.2. Cinética de consumo de glicose por *Yarrowia lipolytica* cultivada em biorreator de 2 L (1,5 L de volume útil de meio) em YPD*, com aeração de 1,5 L min^{-1} nas seguintes condições de agitação e concentração de PFC: (□) 250 rpm, 0% (v/v) de PFC; (■) 250 rpm, 20% (v/v) de PFC; (Δ) 350 rpm, 0% (v/v) de PFC; (▲) 350 rpm, 20% (v/v) de PFC.

É possível notar que a condição de cultivo que se destacou foi 350 rpm na presença de PFC. Houve tanto um crescimento celular e como um consumo de glicose mais acelerado (Tabela 9.1), assim como o nível de oxigênio dissolvido (OD) manteve-se acima de 2,4 mg mL^{-1}.

Tabela 9.1. Parâmetros de crescimento celular do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L (1,5 L de volume útil de meio) em YPD*, com aeração de 1,5 L min^{-1}.

	μ (h^{-1})	- dS/dt (mg mL^{-1} h^{-1})
250 rpm		
0% PFC	0,07 ± 0,00	0,16 ± 0,00
20% PFC	0,10 ± 0,01	0,18 ± 0,02
350 rpm		
0% PFC	0,10 ± 0,01	0,30 ± 0,02
20% PFC	0,14 ± 0,02	0,81 ± 0,10

±: desvio padrão (baseado em dois experimentos realizados nas mesmas condições).

Quando o sistema estava sob agitação de 250 rpm, a adição de 20% (v/v) de PFC aumentou ligeiramente a taxa específica de crescimento celular e não teve influência significativa sobre a taxa de consumo de glicose. Além disso, nessas condições a adição de PFC não evitou que a concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo chegasse a valores próximos a zero (Figura 9.3), mas observa-se alguns valores de OD mais elevados do que o controle. A velocidade de agitação de 250 rpm não foi suficiente para dispersar todo o PFC e, portanto, o efeito benéfico do PFC não foi tão evidenciado. Como foi visto no Capítulo 8, na presença ou ausência de células (Figura 8.6) o valor de k_La aumenta ligeiramente quando a agitação do sistema é 250 rpm.

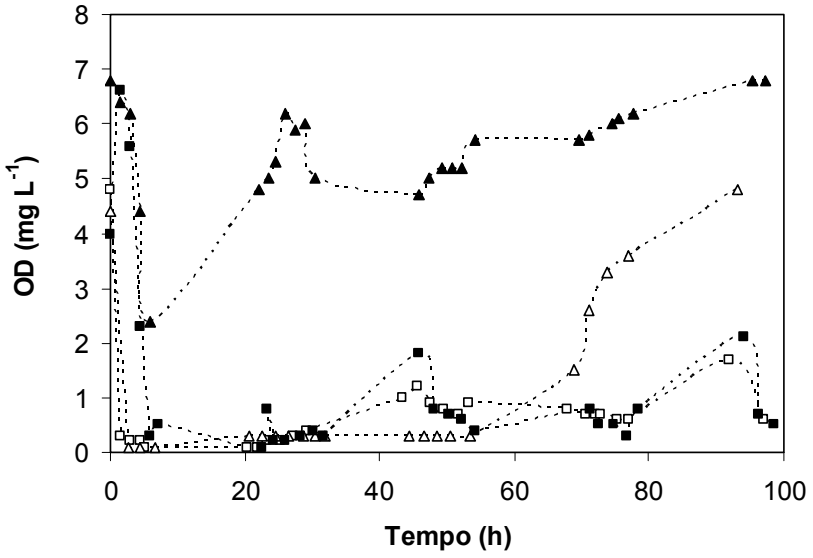

Figura 9.3. Concentração de oxigênio dissolvido (OD) durante o cultivo de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L (1,5 L de volume útil de meio) em YPD*, com aeração de 1,5 L min^{-1} nas seguintes condições de agitação e concentração de PFC: (□) 250 rpm, 0% (v/v) de PFC; (■) 250 rpm, 20% (v/v) de PFC; (Δ) 350 rpm, 0% (v/v) de PFC; (▲) 350 rpm, 20% (v/v) de PFC.

No entanto, quando a agitação do sistema foi elevada para 350 rpm, houve maior dispersão do PFC (observação visual) e o aumento do valor de k_La foi significativo (Figura 8.6). Desta forma, o PFC pode exercer sua função de carreador de oxigênio para o metabolismo microbiano, pois proveu um alívio na limitação de oxigênio, permitindo maior taxa de crescimento celular e consumo de glicose mais acelerado, assim como evitou a queda acentuada dos níveis de oxigênio dissolvido.

9.2. Produção de Lipase

A Figura 9.4 apresenta os perfis de produção de lipase por *Y. lipolytica* cultivada em biorreator de 2 L, sob agitação de 250 e 350 rpm, com e sem adição de 20% (v/v) de PFC. Novamente, assim como para o crescimento celular, para o consumo de glicose e para a concentração de OD, destaca-se a condição de cultivo de 350 rpm e presença de 20% (v/v).

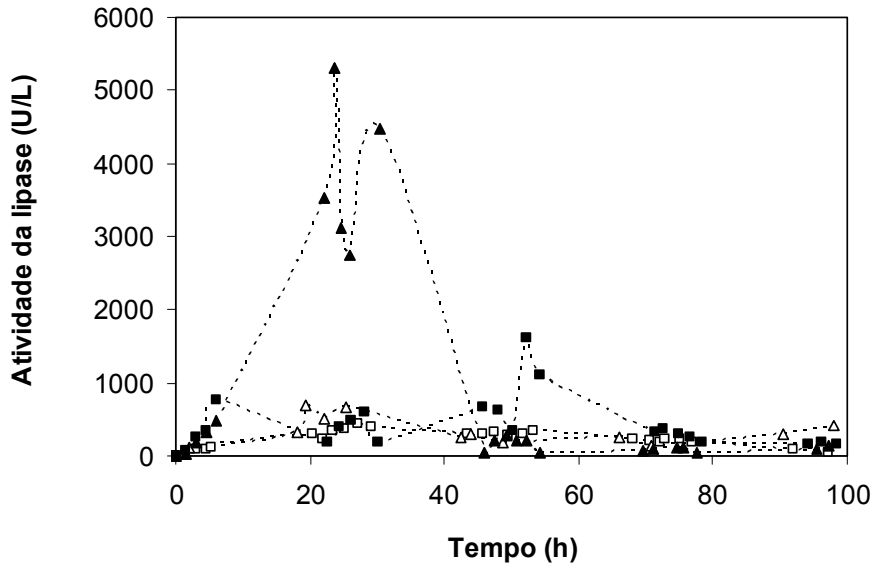

Figura 9.4. Cinética de produção de lipase durante o cultivo de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L (1,5 L de volume útil de meio) em YPD*, com aeração de 1,5 L min^{-1} nas seguintes condições de agitação e concentração de PFC: (□) 250 rpm, 0% (v/v) de PFC; (■) 250 rpm, 20% (v/v) de PFC; (Δ) 350 rpm, 0% (v/v) de PFC; (▲) 350 rpm, 20% (v/v) de PFC. O desvio padrão variou de 3 a 12%.

A Figura 9.4 mostra que a lipase é produzida logo no início do cultivo, no entanto, maiores valores de atividade são obtidos na fase de desaceleração do crescimento celular. PEREIRA-MEIRELLES *et al.* (1997) propuseram um mecanismo

para a produção de lipase de *Y. lipolytica* em meio contendo óleo de oliva como fonte de carbono, em que a lipase é produzida no início do cultivo, mas se acumula na parede celular, enquanto o substrato é abundante. Com a continuação da fermentação, a disponibilidade de substrato diminui e a liberação da enzima se torna necessária para hidrólise do substrato remanescente. Portanto, obtém-se atividade lipásica máxima durante a fase estacionária do crescimento.

Na presença de um substrato de fácil assimilação, como a glicose, o metabolismo se torna mais acelerado. No entanto, a glicose não é um substrato indutor para síntese de lipase. Apesar disso, observamos no presente trabalho que *Y. lipolytica* produz lipase desde o início do cultivo em meio contendo glicose como fonte de carbono. Estudos mostram que a produção da lipase por diferentes microorganismos parece ser constitutiva e independente da adição de substratos lipídicos, embora sua presença aumente os níveis de produção (POKORNY *et al.*, 1994; DALMAU *et al.*, 2000). Portanto, quando se utiliza glicose como fonte de carbono, parece que a lipase começa a ser liberada para o meio extracelular logo no início do cultivo para "buscar" um substrato triglicerídico. Quando a glicose começa a escassear, a atividade extracelular da lipase aumenta ainda mais, pois o microrganismo precisa encontrar uma fonte de carbono alternativa. Portanto, na presença de glicose como fonte de carbono, obtém-se a produção antecipada de lipase em relação à produção com óleo de oliva.

ALONSO (2001) cultivou *Y. lipolytica* em um biorreator de 2 L com meio contendo óleo de oliva como fonte de carbono e obteve 5.300 U L^{-1} de atividade lipásica máxima (pelo método espectrofotométrico) quando o sistema estava sob agitação de 200 rpm, que foi a velocidade de agitação que promoveu maior produção de lipase em uma faixa que variou de 100 a 400 rpm. A Figura 9.4 mostra que para o cultivo de *Y. lipolytica* em biorreator de 2 L com meio contendo glicose como fonte de carbono, a melhor agitação para produção de lipase foi 350 rpm (a velocidade de agitação máxima estudada até então) com um valor de 1.259 U L^{-1}. Apesar do valor inferior obtido no presente trabalho, a produção tardia detectada por ALONSO (2001) (240 horas) conferiu uma produtividade 5 vezes inferior para o cultivo com óleo de oliva como fonte de carbono. Com a adição de PFC, o valor de atividade lipásica máxima obtido foi ainda maior, conferindo uma produtividade 10 vezes maior que a obtida por ALONSO (2001).

É possível observar na Figura 9.4 que quando o sistema foi agitado a 250 rpm, mesmo que a adição de PFC não tenha beneficiado significativamente o metabolismo celular (Figura 9.1; Figura 9.2) ou o valor de k_La (Figura 8.6), sua presença no meio de cultivo aumentou a produção e produtividade da lipase em comparação ao controle (sem PFC). Tal observação é evidenciada na Tabela 9.2, onde se verificam aumentos de 3,7 e

5,5 vezes na produção e produtividade máxima, respectivamente, com a adição de PFC em comparação com o controle.

Tabela 9.2. Parâmetros de produção de lipase do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L (1,5 L de volume útil de meio) em YPD*, com aeração de 1,5 L min^{-1}.

	Atividade lipásica máxima (U L^{-1})	Produtividade máxima (U L^{-1} h^{-1})
250 rpm		
0% PFC	444 ± 24	23 ± 3
20% PFC	1625 ± 100	125 ± 3
350 rpm		
0% PFC	1259 ± 150	113 ± 12
20% PFC	5310 ± 478	226 ± 20

±: desvio padrão (baseado em dois experimentos realizados nas mesmas condições).

É possível observar na **Error! Reference source not found.**, que o aumento na produção da lipase devido à adição de PFC foi maior quando o sistema foi agitado a 350 rpm. Sob essa agitação, com a adição de 20% (v/v) de PFC a produção da lipase aumentou 4,2 vezes em relação ao controle (sem PFC).

Comparando os cultivos realizados com 20% de PFC sob agitação de 250 rpm e na ausência de PFC sob agitação de 350 rpm, observa-se uma maior taxa de consumo de glicose, sugerindo um metabolismo celular mais acelerado no segundo caso (Figura 9.2; Tabela 9.1). Mesmo assim, com agitação menor (250 rpm) e na presença de PFC observa-se uma produção e produtividade da lipase ligeiramente maior. Medidas de k_La com células inativas (Figura 8.6) mostram que o valor de k_La é maior para o sistema com maior agitação e sem PFC independente da concentração de células estudada. A Tabela 9.3 mostra os valores de k_La medidos nas duas condições (250 rpm com 20% (v/v) de PFC e 350 rpm sem PFC) com células inativas e durante o cultivo e produção de lipase. Os resultados indicam que a o aumento da agitação de 250 rpm para 350 rpm foi mais eficaz para a transferência de oxigênio do que a adição de PFC, pois os valores de k_La obtidos para a condição de 250 rpm e 20% (v/v) de PFC foram ligeiramente menores que para a condição de 350 rpm e sem PFC. Tais fatos sugerem que a adição de PFC promove um aumento na produção de lipase não apenas pelo aumento da transferência de oxigênio, em alguns casos, mas também devido a um possível efeito indutor. Mesmo não sendo um composto metabolizado pelo microrganismo, a perfluorodecalina é um composto hidrofóbico e assim sendo, pode ter algum efeito indutor na produção de lipase de *Y. lipolytica*.

Tabela 9.3. Medidas de k_La realizadas com células inativas e durante o cultivo de *Yarrowia lipolytica* em meio YPD* sob agitação de 250 rpm na presença de 20% (v/v) de PFC e sob agitação de 350 rpm sem PFC.

	250 rpm; 20% (v/v) PFC	350 rpm 0% (v/v) PFC
Medida realizada com Células inativas		
Concentração celular (g L^{-1})	k_La (h^{-1})	
0	50,1 ± 4,0	58,5 ± 3,7
5	55,1 ± 4,1	52,8 ± 4,2
10	31,9 ± 2,6	49,4 ± 3,9
Medidas realizadas durante o Cultivo		
Tempo de cultivo (h)	k_La (h^{-1})	
20	4,7 ± 0,4	11,9 ± 0,9
50	11,5 ± 0,9	23,4 ± 1,8

Como não foram observadas reduções no crescimento celular nem na produção de lipase com o aumento da agitação do sistema, supôs-se que não houve perda de viabilidade celular com o aumento da tensão cisalhante e, portanto, maiores agitações foram testadas.

9.3. Aumento da Agitação do Sistema

Observou-se que aumentando a agitação do sistema para 450 rpm havia conduzido a incrementos no crescimento celular assim como na produção de lipase, mesmo na ausência de PFC. Portanto, optou-se por estudar o cultivo de *Y. lipolytica* em biorreator de 2 L, com e sem PFC, ampliando a faixa de agitação do sistema para 550 e 650 rpm.

9.3.1. Cinética de Crescimento Celular

A Tabela 9.4 apresenta os resultados obtidos para o cultivo de *Y. lipolytica* em biorreator com aeração de 1,5 L min^{-1} na ausência e na presença de PFC.

Tabela 9.4. Parâmetros de crescimento celular determinados para o cultivo de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L (1,5 L de volume útil de meio) em YPD*, com aeração de 1,5 L min^{-1}.

	μ (h^{-1})	- dS/dt (mg mL^{-1} h^{-1})
450 rpm		
0% PFC	0,23 ± 0,01	0,51 ± 0,02
550 rpm		
0% PFC	0,30 ± 0,01	0,48 ± 0,01
20% PFC	0,76 ± 0,01	1,29 ± 0,05
650 rpm		
0% PFC	0,31 ± 0,02	0,64 ± 0,03
20% PFC	1,02 ± 0,12	1,47 ± 0,05

±: desvio padrão (baseado em dois experimentos realizados nas mesmas condições).

Foi possível observar na Tabela 9.4 que com o aumento da agitação do sistema (550 e 650 rpm) percebe-se a influência maior da adição de PFC na taxa específica de crescimento celular, assim como na taxa de consumo de glicose, em comparação com as menores agitações estudadas (Tabela 9.1).

Observa-se na Figura 9.5 que, em nenhuma condição de cultivo, o valor de oxigênio dissolvido chega a zero. Entretanto, na ausência de PFC esse parâmetro atinge valores inferiores a 2,0 mg de oxigênio dissolvido por litro, o que já pode causar certa limitação de oxigênio para as células. Com a adição de PFC, a redução da concentração de oxigênio dissolvido devido ao metabolismo microbiano é muito inferior, o que demonstra que o carreador de oxigênio supre a carência de oxigênio do cultivo e não permite que um substrato essencial, como o oxigênio, se torne escasso. Desta forma, com a adição de PFC os microrganismos não têm seu metabolismo limitado, i.e. mantendo-o em condições adequadas por um período maior de tempo, o que pode permitir uma maior produtividade do metabólito de interesse.

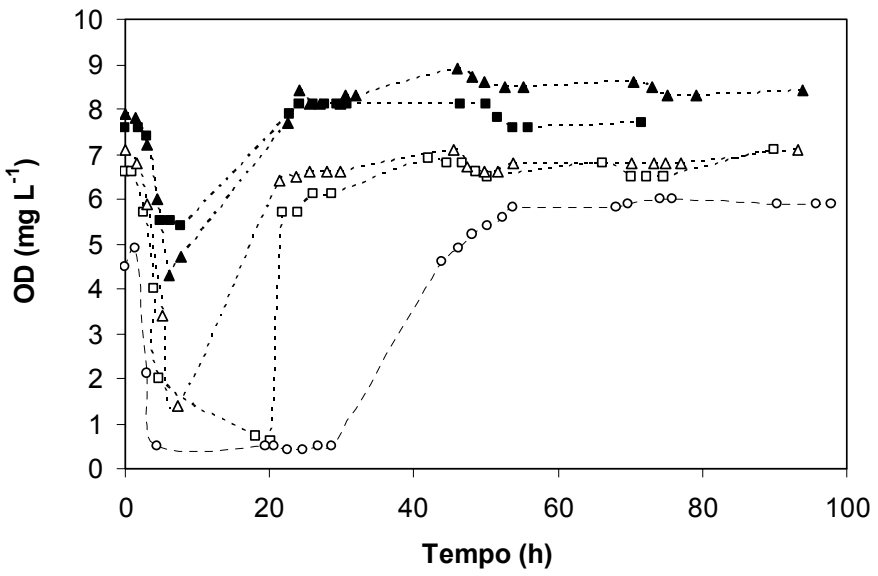

Figura 9.5. Concentração de oxigênio dissolvido (OD) durante o cultivo de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L (1,5 L de volume útil de meio) em YPD*, com aeração de 1,5 L min^{-1} nas seguintes condições de agitação e concentração de PFC: (○) 450 rpm, 0% (v/v) de PFC; (□) 550 rpm, 0% (v/v) de PFC; (■) 550 rpm, 20% (v/v) de PFC; (Δ) 650 rpm, 0% (v/v) de PFC; (▲) 650 rpm, 20% (v/v) de PFC.

9.3.2. Produção de Lipase

Os perfis de produção de lipase por *Y. lipolytica* cultivada em biorreator de 2 L, sob agitação de 550 e 650 rpm, com e sem adição de 20% (v/v) de PFC são apresentados na Figura 9.6. Da mesma forma que nos cultivos realizados a 250 e 350 rpm, a lipase foi obtida durante a fase de desaceleração do crescimento celular, quando o substrato (glicose) começa a escassear no meio.

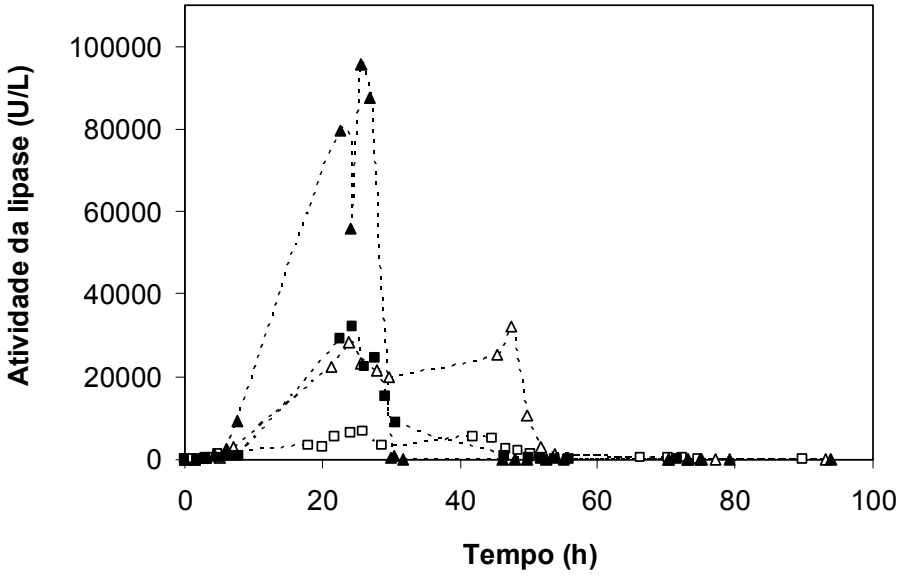

Figura 9.6. Cinética de produção de lipase durante o cultivo de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L (1,5 L de volume útil de meio) em YPD*, com aeração de 1,5 L min^{-1}, nas seguintes condições de agitação e concentração de PFC: (□) 550 rpm, 0% (v/v) de PFC; (■) 550 rpm, 20% (v/v) de PFC; (Δ) 650 rpm, 0% (v/v) de PFC; (▲) 650 rpm, 20% (v/v) de PFC. O desvio padrão variou de 3 a 14%.

Nota-se que com o aumento da agitação do sistema, de 250 a 350 rpm para 550 a 650 rpm, foi possível obter valores ainda maiores de produção de lipase, principalmente na presença de PFC. CHEN *et al.* (1999) reportaram que a produção de lipase de *Acinetobacter radioresistens* em um biorreator de 2 L não foi influenciada pela concentração de oxigênio dissolvido no meio, mas sim pelo o aumento da agitação do sistema de 400 para 600 rpm, obtendo um valor máximo em torno de 12.000 U L^{-1}, utilizando o método da titulação para a dosagem de lipase.

Alguns autores sugeriram que a atividade lipásica medida no meio de cultivo representa o balanço entre a atividade produzida e a atividade degradada por ação de proteases produzidas pelo próprio microrganismo (PEREIRA-MEIRELLES *et al.*, 1997; MARTINS, 2001). De fato, a produção de proteases durante o cultivo de *Y. lipolytica* foi detectada, como mostra a Figura 9.7.

Observa-se que durante o pico de atividade lipásica (entre 18 e 30 horas de cultivo, Figura 9.6), há um aumento de atividade proteásica (Figura 9.7), o que, provavelmente culmina com a degradação da lipase, observada pela redução da atividade em tempos posteriores. Os resultados também mostram que a condição de menor agitação (500 rpm) promoveu maior produtividade da protease, o foi também obervado por ALONSO (2001) para um cultivo de *Y. lipolytica* em biorreator com agitação variando entre 100 e 400 rpm.

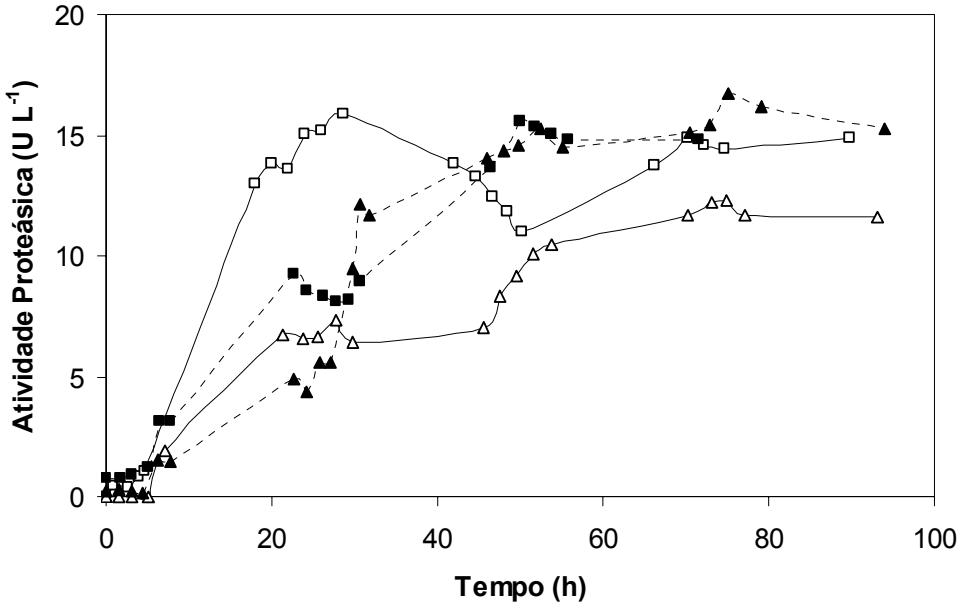

Figura 9.7. Cinética de produção de protease durante o cultivo de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L (1,5 L de volume útil de meio) em YPD*, com aeração de 1,5 L min^{-1}, nas seguintes condições de agitação e concentração de PFC: (□) 550 rpm, 0% (v/v) de PFC; (■) 550 rpm, 20% (v/v) de PFC; (Δ) 650 rpm, 0% (v/v) de PFC; (▲) 650 rpm, 20% (v/v) de PFC.

A Figura 9.7 destaca que entre 20 e 30 horas de cultivo, a condição que apresentou menor atividade proteásica foi 650 rpm na presença de 20% (v/v) de PFC. Neste período a produção de lipase foi máxima para essa condição, sendo o valor inferior de atividade proteásica uma grande vantagem para o processo de recuperação da lipase produzida dado que a protease é um interferente durante esse processo. Ainda assim, é provável que a adição de inibidores de protease, como o fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), seja necessário durante a produção e/ou recuperação da lipase, de forma a evitar a degradação da enzima.

A Tabela 9.5 apresenta os valores de produção e produtividade máximas de lipase para os cultivos realizados sob agitação de 550 e 650 rpm na presença e ausência de PFC. É possível observar que o aumento causado na produção e produtividade máximas pela adição de PFC quando o sistema foi agitado a 550 rpm (4,8 e 4,6, respectivamente) foi maior do que sob agitação de 650 rpm (3,0 e 3,1, respectivamente).

Tabela 9.5. Parâmetros de produção de lipase do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L (1,5 L de volume útil de meio) em YPD*, com aeração de 1,5 dm^3 min^{-1}.

	Atividade lipásica máxima ($U\ L^{-1}$)	Produtividade máxima ($U\ L^{-1}\ h^{-1}$)
550 rpm		
0% PFC	6797 ± 884	288 ± 21
20% PFC	32338 ± 4527	1334 ± 187
650 rpm		
0% PFC	32115 ± 3854	1191 ± 155
20% PFC	95580 ± 13381	3724 ± 521

±: desvio padrão (baseado em dois experimentos realizados nas mesmas condições).

Medidas de k_La no início do cultivo revelaram um aumento de 2,7 vezes no coeficiente de transferência de oxigênio com a adição de PFC para a agitação de 550 rpm e um aumento de 1,9 vezes para a agitação de 650 rpm. Portanto, os resultados sugerem que a partir de uma determinada velocidade de agitação o efeito benéfico da adição de PFC na transferência de oxigênio começa a reduzir. Desta forma, tem-se um menor aumento na produção de lipase com o aumento da velocidade de agitação. Essa redução pode ser devido a maior produção de emulsionante pela levedura, já que foi visto que a produção do bioemulsionante de *Y. lipolytica* aumenta com o aumento da agitação do sistema (Figura 7.1 do Capítulo 7). Dados obtidos por VIDAL *et al*. (2007) mostram que a adição de surfactantes no meio de cultivo de *Y. lipolytica* prejudica o efeito benéfico do PFC, principalmente se a concentração for acima da concentração micelar crítica do surfactante.

Ainda assim, com o aumento da agitação de 550 para 650 rpm, na presença de PFC, houve um aumento no valor de k_La de aproximadamente 2 vezes, o que promoveu um aumento na produção e produtividade de aproximadamente 3 vezes. A Figura 9.8 apresenta o gráfico de produção de lipase máxima *versus* o valor de k_La medido no início do cultivo (aproximadamente 1 hora após inoculação). É possível notar que há uma correlação linear satisfatória (coeficiente de ajuste linear está acima de 0,99) entre a produção de lipase máxima e o valor de k_La para valores de k_La acima de 50 h^{-1}. A não homogeneidade do sistema multifásico quando a agitação do sistema é baixo não permite que a correlação se estenda para baixos valores de agitação, mas é possível utilizar a correlação para estudos de ampliação de escala.

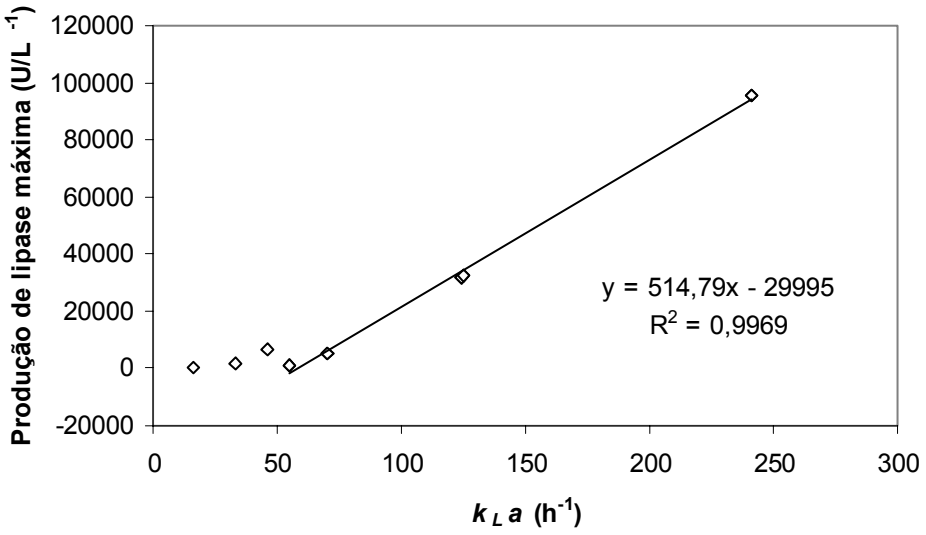

Figura 9.8. Correlação para a produção de lipase máxima de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L com k_La.

9.4. Conclusões Parciais do Capítulo 9

O efeito benéfico da adição de 20% (v/v) de perfluorodecalina nos cultivos de *Y. lipolytica* realizados em biorreator de 2 L com meio YPD* só foi evedenciado com agitação do sistema maior que 350 rpm. A partir desse valor de agitação, o PFC começou a ser totalmente disperso, permitindo o aumento da transferência de oxigênio nos cultivos. Mesmo assim, com a agitação de 250 rpm, houve aumento na produção de lipase, mostrando um possível efeito indutor pela presença de um composto hidrofóbico no meio de cultivo.

A partir de 350 rpm foi possível observar um aumento na concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo com a adição de PFC, o que permitiu um alívio na limitação de oxigênio, possibilitando a manutenção do metabolismo celular em níveis adequados à produção por mais tempo.

Com o aumento da agitação para 550 e 650 rpm houve um aumento da taxa de crescimento celular e consumo de glicose ainda maior com a adição de PFC. A produção de lipase foi beneficiada pela adição de PFC em todas as velocidades de agitação estudadas, sendo que a 650 rpm houve uma pequena redução do aumento de produção lipásica pela adição de PFC em relação ao controle (sem PFC).

Medidas de k_La durante o cultivo revelaram uma relação linear entre a produção máxima de lipase e o coeficiente de transferência do oxigênio do meio, o que demonstra a influência da taxa de transferência de oxigênio na produção de lipase de *Y. lipolytica*.

10. AVALIAÇÃO ECONÔMICA DA PRODUÇÃO DE LIPASE

Os cultivos realizados em biorreator de 2 L para produção de lipase de *Y. lipolytica* em meio YPD* apresentaram resultados bastante promissores para uma possível produção industrial, principalmente na presença de PFC. No entanto, para que se confirme que o processo tem potencial para produção industrial e comercialização do produto final, é necessário que se analise a viabilidade econônica do processo.

A avaliação econômica de um processo em escala de laboratório se difere bastante da avaliação do mesmo processo em escala industrial, pois as matérias-primas são mais caras quando se compra quantidades pequenas, os equipamentos utilizados além de serem menores podem ser diferentes, etc. No entanto, será feita uma avaliação econômica do processo em escala de laboratório, pois isso permitirá uma estimativa inicial da viabilidade do processo.

O primeiro passo para a avaliação econômica de um processo é a construção de um fluxograma. A Figura 10.1 apresenta o fluxograma da produção em escala de laboratório do processo de produção de lipase em biorreator de 2 L, utilizado para obtenção dos resultados do Capítulo 9. As condições de produção que serão avaliadas são as que promoveram maior produtividade da lipase na presença e ausência de PFC, ou seja, agitação de 650 rpm e aeração de 1,5 L min^{-1}. Nessas condições a atividade lipásica do extrato enzimático obtido na ausência de PFC foi 28.290 U L^{-1} e na presença de PFC foi 95.580 U L^{-1} (Figura 9.6). A maior produtividade da lipase na ausência de PFC foi obtida com 23,7 horas de fermentação e na presença de PFC foi obtida com 25,7 horas de fermentação. Será considerado o tempo de 25 horas para ambos os casos de forma a facilitar os cálculos, dado que a difereça de produtividade considerando o tempo de 25,0 horas é menor que 10%.

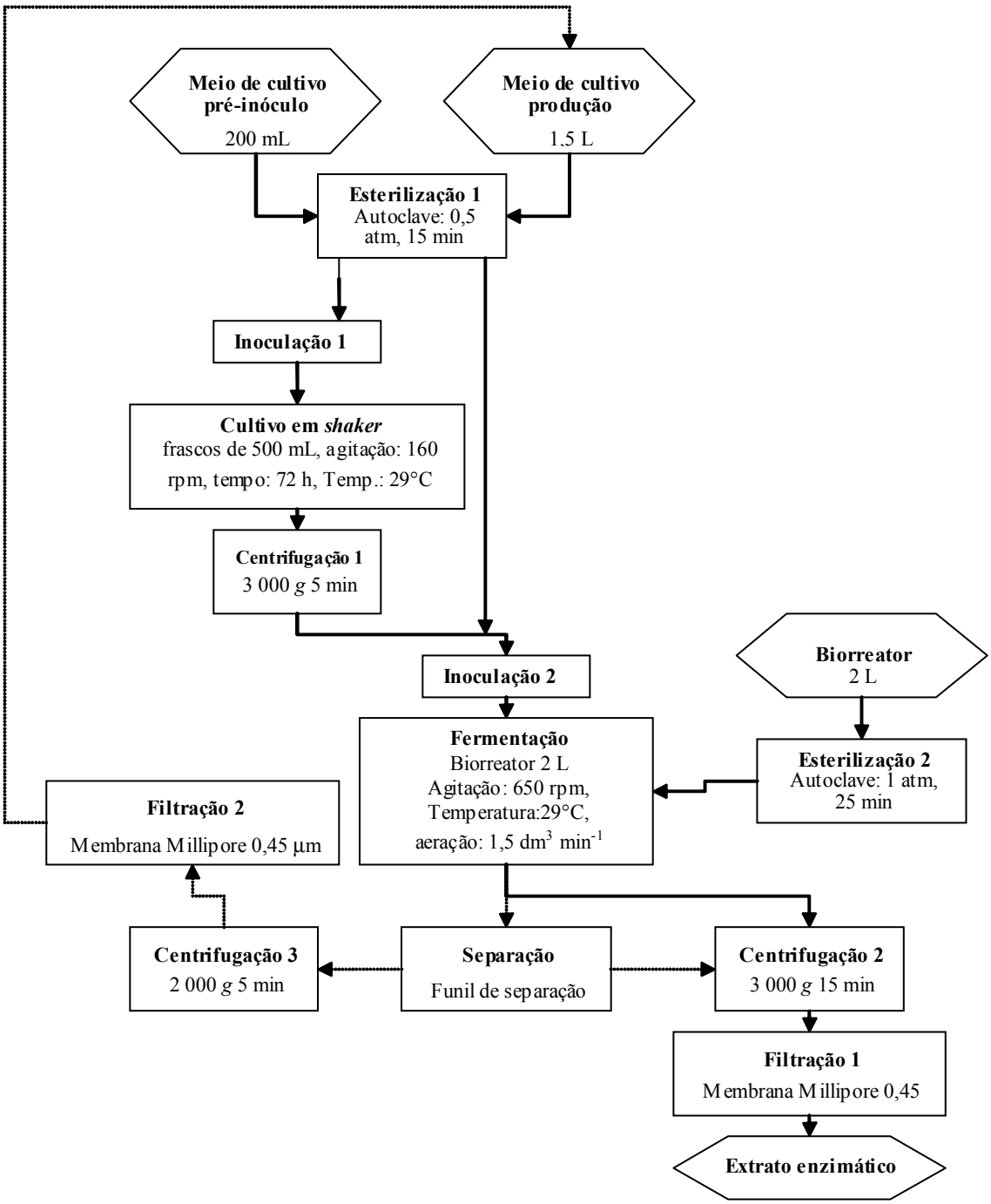

Figura 10.1. Diagrama de blocos do processo de produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2L. As linhas contínuasrepresentam o processo realizado na ausência de PFC e as linhas tracejadas representam o processo na presença de PFC.

Antes de se estimar os custos anuais da produção, é importante estimar o retorno anual de vendas, RV, pois se esse valor não for maior que o custo da matéria-prima, torna-se desnecessário considerar o processo (SEIDER *et al.*, 2003). O RV baseia-se no preço de venda do produto por unidade e na quantidade de produto produzido para venda.

Para o cálculo do RV do extrato enzimático obtido pelo processo descrito no diagrama de blocos da Figura 10.1, é necessário ter como referência um produto similar, vendido no mercado. Será utilizado como referência o produto Lipozyme® CALB L, que é o extrato enzimático obtido por fermentação submersa de *Aspergillus niger* geneticamente modificado, contendo uma lipase de *Candida antartica* (tipo B) (*Novozymes*, Araucária, PR). A cotação deste produto fornecida em julho de 2006 pela *Novozymes* (Araucária, PR, Brasil) indicou o preço de US$ 138,36 por kilograma de produto.

Dados obtidos pelo Grupo (Brígida, 2007) de Engenharia de Biosistemas da Escola de Química da UFRJ mostram algumas similaridades entre este produto e o extrato enzimático produzido no presente trabalho, em relação ao pH ótimo e temperatura ótima de atuação. Medidas de atividade lipásica pelo método espectrofotométrico indicam um valor de 53.100 U L^{-1} para o extrato enzimático da *Novozymes*. Considerando uma relação linear entre o preço do produto e o valor de atividade encontrado no extrato enzimático, podemos estimar o preço do extrato enzimático obtido pelo processo descrito na Figura 10.1, na ausêcia de PFC (atividade lipásica = 28.290 U L^{-1}), como sendo US$ 73,71 kg^{-1} e, pelo mesmo processo na presença de PFC (atividade lipásica = 95.580 U L^{-1}), o preço passa a ser US$ 249,05 kg^{-1}.

10.1. Avaliação Econômica do Processo realizado na ausência de PFC

A Tabela 10.1 apresenta os custos das matérias-primas utilizadas no processo descrito na Figura 10.1, realizado na ausência de PFC, considerando uma batelada, ou seja, obtenção de 1,5 L de extrato enzimático.

Considerando que cada batelada é realizada em 25 horas e incluindo mais 1 hora para inoculação do meio de produção e 2 horas para as etapas de *downstream* (centrifugação 2 e filtração 1), tem-se que o tempo necessário para a realização de uma batelada é de 28 horas. Considerando uma planta de produção operando 330 dias por ano (SEIDER *et al*., 2003), tem-se que o custo anual de matérias-primas (CMP) é:

$$CMP = \frac{US\$18{,}03}{batelada} * \frac{1\ batelada}{28\ horas} * \frac{24\ horas}{1\ dia} * \frac{330\ dias}{ano} = \frac{US\$5101{,}27}{ano}$$

Tabela 10.1. Custos das matérias-primas do processo de produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L com 1,5 L de meio YPD* sob agitação de 650 rpm e aeração de1,5 L min^{-1}, na ausência de PFC.

	Concentração (g L^{-1})	Massa (g (batelada)$^{-1}$)	Preço (US$ g^{-1})[a]	Custo (US$ (batelada)$^{-1}$)
Reagentes do meio de Produção (1,5 L)				
Glicose[b]	20,0	30,0	0,04	1,14
Peptona[c]	6,4	9,6	0,67	6,47
Extrato de Lêvedo[d]	10,0	15,0	0,45	6,68
Reagentes do meio de cultivo pré-inóculo (0,2 L)				
Glicose[b]	20,0	4,0	0,04	0,15
Peptona[c]	20,0	4,0	0,67	2,70
Extrato de Lêvedo[d]	10,0	2,0	0,45	0,89
Total – Custo de matéria-prima por batelada				18,03

[a] Preço em reais (R$) fornecido pela empresa *Termo-Rio Científica Ltda* (RJ, Brasil) no dia 23 de julho de 2007 e convertido em dólares (US$) pela cotação do dia (R$1,84/US$) fornecida pelo Banco do Brasil.
[b] Glicose - *Reagen* (R.J., Brasil).
[c] Peptona bacteriológica - *Oxoid* (Hampshire, UK).
[d] Extrato de lêvedo - *Oxoid* (Hampshire, UK).

O processo descrito na Figura 10.1, na ausência de PFC, produz 1,5 L de extrato enzimático por batelada. Considerando uma perda durante o processo de 5% por batelada (SEIDER *et al.*, 2003) e a densidade do extrato próxima da água, ou seja, 1,01 g cm^3, tem-se a produção de 1,44 kg de extrato por batelada. Portanto o retorno anual de vendas (RV) é:

$$RV = \frac{US\$73,71}{kg} * \frac{1,44\,kg}{batelada} * \frac{1\,batelada}{28\,horas} * \frac{24\,horas}{1\,dia} * \frac{330\,dias}{ano} = \frac{US\$30024,70}{ano}$$

Sendo RV maior que o custo anual de matéria-prima (CMP), pode-se considerar que o processo apresenta um grande potencial para ser economicamente viável. Entretanto ainda é necessário considerar outros custos do processo.

O lucro bruto (LB) pode ser calculado pela diferença entre o retorno anual de vendas e o custo anual de produção sem considerar as taxas governamentais (SEIDER *et* al., 2003). Fazendo-se uma estimativa inicial do lucro bruto, ou seja, calculando o que pode se chamar de lucro bruto inicial (LBI), considerando apenas os custos de matéria-prima, sem levar em consideração os custos de operação da planta, tem-se que:

$$LBI = RV - CMP = \frac{US\$30024,70}{ano} - \frac{US\$5101,27}{ano} = \frac{US\$24923,43}{ano}$$

Tem-se, portanto, um lucro bruto inicial de US$ 24.923,43 por ano. No entanto, é necessário computar os gastos com utilidades, com operadores, etc para se determinar se o processo é realmente economicamente viável em escala de laboratório.

A Tabela 10.2 apresenta os custos de utilidade do processo descrito na Figura 10.1. Utilizou-se apenas eletricidade como utilidade, o que é plausível para um processo em escala de laboratório. Para um processo em escala piloto ou industrial seria necessário modificar as operações de forma a reduzir os custos.

Tabela 10.2. Custos da energia elétrica consumida durante o processo de produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L com 1,5 L de meio YPD* sob agitação de 650 rpm e aeração de1,5 L min^{-1}, na ausência de PFC.

Operação	Potência do equipamento (kW)	Tempo de utilização do equipamento (h (batelada)$^{-1}$)	Consumo de energia (kWh)	Custo (US$ (batelada)$^{-1}$)[a]
Esterilização 1	2,00	0,250	0,500	0,420
Shaker	0,65	70,000	45,500	3,780
Centrifugação 1	0,54	0,083	0,045	0,004
Esterilização 2	2,00	0,417	0,833	0,069
Fermentação	1,16	25,000	29,000	2,409
Centrifugação 2	0,54	1,000[b]	0,540	0,045
Filtração 1	0,60	0,250[c]	0,150	0,012
Total – Custo de utilidades por batelada				6,36

[a] Custo de energia (R$0,162/kWh) fornecido pela empresa Automação, Controle e Sistemas Industriais Ltda (www.acs.ind.br) no dia 7 de setembro de 2007 e convertido para US$ pela cotação do dia (R$1,95/US$) fornecida pelo Banco do Brasil.
[b] Considerando que cada ciclo de centrifuação de 15 minutos comporta 400 mL de meio de cultivo, são necessários 4 ciclos, ou seja, 1 hora de utilização da centrífuga.
[c] Considerando a filtração em uma taxa de 0,1 L/h.

Considerando que para cada batelada são necessárias 28 horas e uma planta operando 330 dias por ano, é possível calcular o custo anual de utilidades (CUT):

$$CUT = \frac{US\$6,36}{batelada} * \frac{1\ batelada}{28\ horas} * \frac{24\ horas}{1\ dia} * \frac{330\ dias}{ano} = \frac{US\$1799,27}{ano}$$

De uma forma geral o custo anual de utilidades não contribui significativamente para o preço de venda do produto, variando de 5 a 10% do RV (SEIDER *et al.*, 2003).

Pode-se observar que o CUT para o processo de produção de lipase em biorreator de 2 L na ausência de PFC representa, em torno, de 6% do RV, o que está de acordo com SEIDER *et al*. (2003).

Para estimar os custos de mão de obra, ou seja, os gastos com operadores, pode-se considerar que cada operador de turno trabalha 40 horas por semana e, portanto, são necessários 4,2 turnos por semana (7dias (semana)$^{-1}$*24 horas (dia)$^{-1}$ =168 horas (semana)$^{-1}$) por operador necessário na planta. Segundo SEIDER *et al*. (2003) devido a licenças, férias, treinamentos, etc pode-se considerar 5 turnos por semana por operador requerido. Para um processo em escala de laboratório, podemos considerar 1 operador por turno e apenas 2 turnos por semana, o que é suficiente para que se realize as operações de *upstream* e *dowstream* do processo, além de mais um operador para o controle do processo (análises de laboratório). Podemos considerar também um gasto com assistência técnica, baseando-se em um operador por turno (em um turno por semana) com um salário de técnico (R$ 600,00/mês): valor da bolsa de apoio técnico do CNPq mais benefícios (25%).

Considerando para o processo descrito na Figura 10.1 apenas um operador por turno, a Tabela 10.3 apresenta os custos de mão de obra.

Tabela 10.3. Custos da mão de obra necessária para o processo de produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L com 1,5 L de meio YPD* sob agitação de 650 rpm e aeração de1,5 L min^{-1}, na ausência de PFC.

Mão de obra	Nº de operador por turno	Nº de turnos	Tempo de trabalho (horas (ano)$^{-1}$ (operador)$^{-1}$)	Custo por operador (US$ h^{-1})	Custo (US$ ano^{-1})^{a}
Salários e Benefícios	1	2	2080	3,60	14.933,33
Assistência técnica	1	1	2080	1,79	3.723,20
Controle de laboratório	1	1	2080	3,60	7.466,67
Total – Custo anual de mão de obra					26.123,20

Considerando que cada operador de turno é pago por 40 horas por semana em 52 semanas por ano, paga-se por operador de turno 2.080 horas por ano. Dado o salário completo (salário mais benefícios) de um operador em torno de R$ 1.200,00 por mês (baseando-se no valor de uma bolsa de mestrado do CNPq mais 25% em benefícios), e considerando uma cotação atual para o dólar de R$1,95 por US$, o custo referente aos salários e benefícios anuais (CSB) é (adaptado de SEIDER *et al.* 2003):

$$CSB = \frac{1\ operador}{turno} * 5\ turnos * \frac{2080\ horas}{ano\ (operador)} * \frac{US\$3{,}60}{hora} = \frac{US\$14933{,}33}{ano}$$

Podemos considerar ainda gastos gerais, como gastos com a venda do produto (2% do RV, segundo SEIDER *et al*., 2003) e gastos com pesquisa (4,8% do RV, segundo SEIDER *et al*., 2003).

Com as estimativas de custo de produção é possível obter uma folha de custos e ganhos, como mostra a Tabela 10.4.

Tabela 10.4. Folha de custos e ganhos para o processo de produção de lipase por *Y. lipolytica* em biorreator de 2 L com 1,5 L de meio YPD* sob agitação de 650 rpm e aeração de 1,5 L min^{-1}, na ausência de PFC.

Fator	**Custo anual (US$ (ano)$^{-1}$)**
Matéria –prima	5.101,27
Utilidades	1.799,27
Mão de obra	26.123,20
Custo de produção	33.023,74
Gastos gerais	2.126,75
Custo total do produto (CTP)	35.150,50
Vendas (RV)	30.024,70

Com a folha de custos e ganhos é possível observar que o processo da Figura 10.1 realizado na ausência de PFC é inviável econômicamente dado que o lucro bruto (LB = RV – CTP) é negativo. Sabe-se que os custos de matéria-prima e utilidades em escala industrial são inferiores aos custos em escala de laboratório e os custos com mão de obra também representam um percentual menor do custo total do produto. No entanto, para um processo em escala industrial deve-se considerar outros custos, como custos de manutenção, de depreciação, administrativos, entre outros. Portanto, deve-se considerar uma análise econômica em escala industrial para se ter certeza da inviabilidade econômica do processo.

10.2. Avaliação Econômica do Processo realizado na presença de PFC

A Tabela 10.1 apresenta os custos das matérias-primas utilizadas no processo descrito na Figura 10.1, realizado na presença de 20% (v/v) de PFC, considerando uma batelada, ou seja, obtenção de 1,2 L de extrato enzimático.

Tabela 10.5. Custos das matérias-primas do processo de produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L com 1,2 L de meio YPD* e 300 mL de PFC, sob agitação de 650 rpm e aeração de1,5 L min^{-1}, na presença de 20% (v/v) de PFC.

	Concentração (g L^{-1})	Massa (g (batelada)$^{-1}$)	Preço (US$ g^{-1})	Custo (US$ (batelada)$^{-1}$)
Reagentes do meio de Produção (1,2 L)				
Glicose[a]	20,0	30,0	0,04[e]	1,14
Peptona[b]	6,4	9,6	0,67[f]	6,47
Extrato de Lêvedo[c]	10,0	15,0	0,45[g]	6,68
PFC adicionado ao meio de Produção (0,3 L em 1,2 L de meio)				
Perfluorodecalina[d]	383,4	575,1	0,41[h]	235,86
Reagentes do meio de cultivo pré-inóculo (0,2 L)				
Glicose[b]	20,0	4,0	0,04	0,15
Peptona[c]	20,0	4,0	0,67	2,70
Extrato de Lêvedo[d]	10,0	2,0	0,45	0,89
Total – Custo de matéria-prima por batelada				253,89

[b] Glicose - *Reagen* (R.J., Brasil).
[c] Peptona bacteriológica - *Oxoid* (Hampshire, UK).
[d] Extrato de lêvedo - *Oxoid* (Hampshire, UK).
[e,f,g] Preço em reais (R$) fornecido pela empresa *Termo-Rio Científica Ltda* (RJ, Brasil) no dia 23 de julho de 2007 e convertido em dólares (US$) pela cotação do dia (R$1,84/US$) fornecida pelo Banco do Brasil.
[h] Preço em libras esterlinas (GBP) fornecido pela empresa *Apollo Scientific* (Stockport, UK) no dia 02 de outubro de 2006 e convertido em dólares (US$) pela cotação do dia (US$1,89/GBP) (fonte: http://br.finance.yahoo.com).

Considerando que cada batelada é realizada em 25 horas e incluindo mais 1 hora para inoculação do meio de produção e 2 horas para as etapas de *downstream* (centrifugação 2 e filtração 1), tem-se que o tempo necessário para a realização de uma batelada é de 28 horas. Considerando uma planta de produção operando 330 dias por ano (SEIDER *et al*., 2003), tem-se que o custo anual de matérias-primas é:

$$CMP = \frac{US\$253,89}{batelada} * \frac{1\,batelada}{28\,horas} * \frac{24\,horas}{1\,dia} * \frac{330\,dias}{ano} = \frac{US\$71814,85}{ano}$$

É possível observar um aumento de 14 vezes no custo de matérias-primas com a inclusão do PFC (vide Tabela 10.5). É possível observar na Tabela 10.5 que o preço da perfluorodecalina por grama (US$ g^{-1}), não é alto em comparação com os preços da peptona e do extrato de lêvedo. No entanto a quantidade necessária por batelada é bastante superior, o que torna o custo dessa matéria-prima (por batelada) muito elevado em relação às demais.

No caso do processo descrito na Figura 10.1, na presença de 20% (v/v) de PFC, a produção de extrato enzimático por batelada é de 1,20 L pois 0,30 L é o volume de PFC. Considerando uma perda durante o processo de 5% e a densidade do extrato próxima da água, ou seja, 1,01 g cm^3, tem-se a produção de 1,15 kg de extrato por batelada. Portanto o retorno anual de vendas (RV) é:

$$RV = \frac{US\$249,05}{kg} * \frac{1,15\ kg}{batelada} * \frac{1\ batelada}{28\ horas} * \frac{24\ horas}{1\ dia} * \frac{330\ dias}{ano} = \frac{US\$81011,76}{ano}$$

Pode-se notar que o RV é maior que o custo anual de matéria-prima, podendo-se considerar inicialmente que o processo na presença de PFC apresenta um potencial para ser economicamente viável. Entretanto a diferença entre o valor de RV e do custo de matérias-primas é pequeno em relação ao processo realizado sem PFC. Fazendo-se uma estimativa inicial do lucro bruto, tem-se que:

$$LBI = RV - CMP = \frac{US\$81011,76}{ano} - \frac{US\$71814,85}{ano} = \frac{US\$9196,91}{ano}$$

Nota-se que o lucro bruto inicial para o processo sem a presença de PFC (US$24.923,43/ano) é superior (2,7 vezes) ao lucro bruto inicial do processo com a presença do carreador de oxigênio.

Uma das vantagens de se utilizar o PFC é possibilidade recuperá-lo ao final da batelada. Para os experimentos preliminares realizados em frascos agitados foi possível recuperar em torno de 85% de PFC ao final de cada experimento. No entanto, observou-se que para os experimentos realizados em biorreator, ao final do cultivo não havia mais PFC no biorreator. Provavelmente devido à alta aeração e agitação do sistema houve evaporação desse composto. Apesar disso, ainda notava-se a presença de PFC em até 48 horas de cultivo através da visualização de uma segunda fase no fundo do biorreator após o desligamento da agitação por alguns minutos. Portanto, mediu-se a altura dessa fase no biorreator após, aproximadamente, 24 horas de cultivo. Comparando com a

altura da fase do PFC no início do cultivo, observou-se uma redução de, aproximadamente, 30% na altura da fase do PFC. Considerando o percentual de recuperação dos experimentos realizados em frascos agitados (85%), podemos estimar uma recuperação para o PFC após a batelada de 25 horas em biorreator de, aproximadamente, 60%.

Portanto, considerando a recuperação de 60% de PFC, o custo desse composto por batelada passa a ser US$ 94,34 $(\text{batelada})^{-1}$, o que também reduz o custo total de matérias-primas por batelada para US$ 112,38 $(\text{batelada})^{-1}$. Desta forma, temos um custo anual de matérias-primas de US$ 31786,70 $(\text{ano})^{-1}$. Calculando o lucro bruto inicial, obtém-se:

$$LBI = RV - CMP = \frac{US\$81011,76}{ano} - \frac{US\$31786,70}{ano} = \frac{US\$49225,06}{ano}$$

Nota-se, portanto, que com a recuperação do PFC o processo passa a ter um lucro bruto inicial maior (cerca de 2 vezes) que o lucro bruto inicial do processo realizado na ausência de PFC. No entano, como o processo realizado na presença de PFC apresenta um número maior de operações devido à recuperação desse composto, é necessário calcular os custos de operação da planta, para se afirmar se a presença de PFC é justificável economicamente.

A Tabela 10.2 apresenta os custos de utilidades do processo descrito na Figura 10.1 com a recuperação do PFC.

É possível observar que o custo de utilidades do processo realizado na presença de PFC é inferior ao custo de utilidades do processo realizado na ausência de PFC. Isso se deve ao fato de que o volume a ser tratado por batelada é inferior no caso do processo realizado na presença de PFC (1,20 L) e os custos adicionais para recuperar o PFC não oneram significativamente o processo. Considerando que para cada batelada são necessárias 28 horas e uma planta operando 330 dias por ano, é possível calcular o custo anual de utilidades (CUT):

$$CUT = \frac{US\$6,35}{batelada} * \frac{1\ batelada}{28\ horas} * \frac{24\ horas}{1\ dia} * \frac{330\ dias}{ano} = \frac{US\$1796,88}{ano}$$

Tabela 10.6. Custos de energia elátrica consumida durante o processo de produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L com 1,2 L de meio YPD* e 300 mL de PFC, sob agitação de 650 rpm e aeração de 1,5 L min^{-1}, na presença de 20% (v/v) de PFC.

Operação	Potência do equipamento (kW)	Tempo de utilização do equipamento (h (batelada)$^{-1}$)	Consumo de energia (kWh)	Custo (US$ (batelada)$^{-1}$)[a]
Esterilização 1	2,00	0,250	0,500	0,420
Shaker	0,65	70,000	45,500	3,780
Centrifugação 1	0,54	0,083	0,045	0,004
Esterilização 2	2,00	0,417	0,833	0,069
Fermentação	3,20	25,000	29,000	2,409
Centrifugação 2	0,54	0,750[b]	0,405	0,034
Filtração 1	0,60	0,200[c]	0,120	0,010
Centrifugação 3	0,54	0,083[d]	0,045	0,004
Filtração 2	0,60	0,030[c]	0,018	0,001
Total – Custo de utilidades por batelada				6,35

[a] Custo de energia (R$0,162/kWh) fornecido pela empresa Automação, Controle e Sistemas Industriais Ltda (www.acs.ind.br) no dia 7 de setembro de 2007 e convertido para US$ pela cotação do dia (R$1,95/US$) fornecida pelo Banco do Brasil.
[b] Considerando que cada ciclo de centrifuação de 15 minutos comporta 400 mL de meio de cultivo, são necessários 3 ciclos, ou seja, 0,75 hora de utilização da centrífuga.
[c] Considerando a filtração em uma taxa de 0,1 L/h.
[d] Considerando que cada ciclo de centrifuação de 5 minutos comporta 400 mL de meio de cultivo, é necessário apenas 1 ciclo, ou seja, 0,083 horas de utilização da centrífuga.

Pode-se observar que o CUT para o processo de produção de lipase em biorreator de 2 L na presença de PFC representa, em torno, de 2% do RV, o que inferior ao percentual do CUT (6% do RV) para o processo realizado na ausêcia de PFC.

Os custos de mão de obra e gastos gerais são os mesmos que os considerados para o processo na ausência de PFC. Portanto, é possível obter a folha de custos e ganhos do processo realizado na presença de PFC, considerando sua recuperação, como mostra a Tabela 10.7.

Tabela 10.7. Folha de custos e ganhos para o processo de produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 2 L com 1,2 L de meio YPD* sob agitação de 650 rpm e aeração de 1,5 L min^{-1}, na presença de PFC, considerando sua recuperação.

Fator	Custo anual (US$ (ano)$^{-1}$)
Matéria –prima	31.786,70
Utilidades	1.796,88
Mão de obra	26.123,20
Custo de produção	59.706,78
Gastos gerais	2.126,75
Custo total do produto (CTP)	61.833,53
Vendas (RV)	81.011,76

É possível notar que para o processo realizado na presença de PFC, obtém-se um lucro bruto de US$ 19.178,23 por ano, o que corresponde a 24% do total de vendas (RV). Portanto, o processo de produção de lipase por *Y. lipolytica* em meio YPD* em biorreator de 2 L na presença de PFC apresentou-se viável economicamente. Uma análise econômica para o processo em escala industrial também seria necessário. No entanto, a análise econômica em escala de laboratório indica uma potencialidade de o processo ser economicamente viável.

10.3. Conclusões Parciais do Capítulo 10

A avaliação econômica do processo de produção de lipase por *Y. lipolytica* em biorreator de 2 L em meio YPD* sob agitação de 650 rpm e aeração de 1,5 L min^{-1} mostrou que este processo só é economicamente viável quando realizado na presença de PFC, o que confere maior produtividade da enzima, e considerando a recuperação desse composto, dado que sua utilização no meio de cultivo requer uma grande quantidade, o que onera o processo se não for considerado o procedimento de recuperação.

11. CONCLUSÕES

- ✓ A adição de perfluorodecalina no meio de cultivo beneficiou a taxa específica de crescimento celular de *Y. lipolytica*, principalmente com o aumento da agitação do sistema.
- ✓ A produtividade da lipase aumentou 11 vezes com a adição de 20% (v/v) de PFC quando o sistema foi agitado a 250 rpm com um valor de Vm/Vf de 0,4, em comparação com o controle (sem PFC). Esse efeito foi maior quando o valor de Vm/Vf foi reduzido para 0,2, com um aumento de 23 vezes na produtividade de lipase com a adição de 20% de PFC, em relação ao controle.
- ✓ A enzima produzida por *Y. lipolytica* na ausência e presença de PFC foi confirmada como sendo uma lipase através do método titulométrico. A lipase produzida na presença de 20% (v/v) de PFC apresentou estabilidade razoável por 65 dias quando estocada a -4ºC na presença de PMSF, mantendo 50% da atividade original.
- ✓ As células de *Y. lipolytica* apresentaram uma alta afinidade pelo PFC, o que causou uma partição das células para a fase do PFC, sendo que a mesma aumenta com o incremento da agitação do sistema.
- ✓ *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 apresenta alta adesão a superfícies com características bem diferentes, como poliestireno e vidro, independentemente do pH.
- ✓ Pela definição de VAN OSS (1995) a superfície das células de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 pode ser caracterizada como hidrofílica, apresentando, no entanto, alta afinidade com superfícies, líquidos ou moléculas hidrofóbicas quando imersas em água.
- ✓ A interação entre as células e as superfícies ou compostos hidrofóbicos parece ser mediado por proteínas ou glicoproteínas da parede celular. Além disso, as interações observadas entre as células e solventes apolares estão ligadas às interações apolares ou *Lifshitz-van der Waals*.
- ✓ A produção de atividade emulsionante no meio de cultivo de *Y. lipolytica* em meio YPD* independe da presença de PFC, mas aumenta com o incremento da agitação do sistema.
- ✓ Yansan é um bioemulsionante produzido por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 que consiste em um complexo lipídio-carboidrato-proteína com alta atividade emulsionante e estabilidade em uma larga faixa de pH (3-9) e apresenta habilidade

em formar emulsões com hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos e com perfluorocarbonetos.

- ✓ As interações entre as células de *Y. lipolytica* e a perfluorodecalina nos cultivos de produção de lipase podem ser intermediadas pelo agente emulsionante produzido pela própria levedura, que forma emulsões estáveis entre a fase aquosa e o PFC.
- ✓ A adição de perfluorodecalina no meio aquoso (água ou meio YPD*) promove o aumento do k_La, enquanto que a adição de óleo de oliva reduz o valor desse coeficiente no reator multifásico.
- ✓ O aumento da taxa de transferência de oxigênio promovido pela adição de PFC é devido ao alto coeficiente de difusão e alta solubilidade do oxigênio na fase dispersa (PFC), onde as gotas da fase dispersa carregam o oxigênio da interface gás-líquido para o seio da fase contínua (água ou fase aquosa), chamado "*shuttle mechanism*". Além disso, como as células de *Y. lipolytica* apresentam alta afinidade com o PFC, aderindo-se a este, viabilizando uma possível uma transferência direta do oxigênio do PFC para as células.
- ✓ Foi estabelecida uma correlação matemática que descreve a influência dos parâmetros estudados (agitação, aeração, concentração de PFC e concentração de células) nos valores de k_La com boa concordância com os dados experimentais (desvio médio de ± 15,7 %).
- ✓ O efeito benéfico da adição de 20% (v/v) de perfluorodecalina nos cultivos de *Y. lipolytica* realizados em biorreator de 2 L com meio YPD* só foi evidenciado com agitação do sistema maior que 350 rpm, devido à baixa dispersão do PFC em baixa velocidade de agitação.
- ✓ A taxa de crescimento celular e consumo de glicose aumentaram com a adição de PFC nos cultivos de *Y. lipolytica* realizados em biorreator de 2 L com meio YPD* sob agitação entre 350 e 650 rpm. A produção de lipase foi beneficiada pela adição de PFC em todas as velocidades de agitação estudadas, sendo que a 650 rpm houve uma pequena redução do aumento de produção lipásica pela adição de PFC em relação ao controle (sem PFC).
- ✓ Existe uma relação linear entre o valor de k_La do cultivo e a produção máxima de lipase, o que demonstra a influência da taxa de transferência de oxigênio na produção de lipase de *Y. lipolytica*.
- ✓ A avaliação econômica do processo de produção de lipase por *Y. lipolytica* em biorreator de 2 L em meio YPD* sob agitação de 650 rpm e aeração de 1,5 L min^{-1} mostrou que este processo só é economicamente viável quando realizado na

presença de PFC, o que confere maior produtividade da enzima, e considerando a recuperação desse composto.

12. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Indentificar as moléculas da parede celular envolvidas na adesão das células de *Y. lipolytica* às superfícies e solventes hidrofóbicos, utilizando enzimas líticas específicas;
- ✓ Investigar a produção de lipases por células de *Y. lipolytica* aderidas a suportes hidrofóbicos;
- ✓ Estudar a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio e suas concentrações na produção do bioemulsionante de *Y. lipolytica*, em frascos agitados e em biorreator;
- ✓ Estudar diferentes formas de isolamento e purificação do bioemulsionante de *Y. lipolytica* de forma a otimizar esses processos e avaliar o potencial de aplicação desse bioemulsionante na indústria de alimentos, na área biomédica e na biorremediação de locais contaminados com hidrocarbonetos;
- ✓ Avaliar a capacidade de transferência de oxigênio do biorreator de 2 L em velocidades de agitação maiores que 350 rpm, inclusive variando a concentração de PFC;
- ✓ Estudar a produção de lipase de *Y. lipolytica* em biorreator de 2 L aumentando a agitação do sistema até observar a redução da produtividade da enzima;
- ✓ Estudar a adição de inibidores de protease durante o cultivo de *Y. lipolytica* em biorreator de 2 L de forma a aumentar a produção de lipase e reduzir a degradação dessa enzima durante o processo de recuperação;
- ✓ Purificar a lipase produzida por *Y. lipolytica* em biorreator de 2 L na presença e ausência de PFC, através de etapas de diálise, precipitação com solventes ou sais, cromatografia e/ou liofilização.
- ✓ Realizar um estudo cinético para a lipase produzida por *Y. lipolytica* em biorreator de 2 L obtendo-se a constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima de reação ($V_{máx}$) através da variação da concentração de diferentes substratos, como o *p*-nitrofenil laurato, o óleo de oliva e a tributirina.
- ✓ Estudar a atuação da enzima em substratos diferentes de forma a caracterizar a especificidade da enzima, direcionado suas potenciais aplicações;

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigos completos publicados em periódicos

1. AMARAL, P. F. F., ROCHALEÃO, Maria Helena M, MARRUCHO, Isabel M, COUTINHO, João A P, COELHO, Maria Alice Zarur (2005). "Improving Lipase Production using a Perfluorocarbon as Oxygen Carrier". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.81, p.1368 - 1374.

2. AMARAL, P. F. F., SILVA, Joana Madeira da, LEHOCKY, Marian, TIMMONS, Ana M Barros, MARRUCHO, Isabel M, COELHO, Maria Alice Zarur, COUTINHO, João A P. (2006). Production and Characterization of a Bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*". *Process Biochemistry*, v. 41, p.1894 - 1898.

3. AMARAL, P. F. F., LEHOCKY, Marian, TIMMONS, Ana M Barros, ROCHALEÃO, Maria Helena M, COELHO, Maria Alice Zarur, COUTINHO, João A P (2006). "Cell Surface Characterization of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682". *Yeast*, v.23, p.867 - 877.

4. AMARAL, P. F. F., VIDAL, Ana Paula, PEIXOTO, Tathiana, ROCHALEÃO, Maria Helena M, COUTINHO, João A P, COELHO, Maria Alice Zarur (2006). "Beneficial effects of enhanced aeration using perfluorodecalinin *Yarrowia lipolytica* cultures for lipase production". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.23, p.339 - 344.

5. LEHOCKY, Marian, AMARAL, P. F. F., COELHO, Maria Alice Zarur, STAHEL, Pavel, TIMMONS, Ana M Barros, COUTINHO, João A P (2006). "Attachment/detachment of *Saccharomyces cerevisiae* on plasma deposited organosilicon thin films". *Czechoslovak Journal of Physics*, v.56, p.B1256 - B1262.

6. LEHOCKY, Marian, AMARAL, P. F. F., STAHEL, Pavel, COELHO, Maria Alice Zarur, TIMMONS, Ana M Barros, COUTINHO, João A P (2007). "Preparation and characterization of organosilicon thin films for selective adhesion of *Yarrowia lipolytica* yeast cells". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology,* v.82, p.360 - 366.

Artigos completos aceitos para publicação em periódicos

1. AMARAL, P. F. F., Freire, M. G., ROCHALEÃO, Maria Helena M, MARRUCHO, Isabel M, COUTINHO, João A P, COELHO, Maria Alice Zarur (2007). "Optimization of Oxygen Mass Transfer in a Multiphase Bioreactor with Perfluorodecalin as a Second Liquid Phase". *Biotechnology and Bioengineering*.

2. LEHOCKY, Marian, AMARAL, P. F. F., STAHEL, Pavel, COELHO, Maria Alice Zarur, TIMMONS, Ana M Barros, COUTINHO, João A P (2007). "Deposition of *Yarrowia lipolytica* on Plasma Prepared Teflon-Like Thin Films". *Surface Engineering*.

Artigos submetidos para publicação

1. BRÍGIDA, A. I. S., AMARAL, P. F., GONÇALVES, L. R. e COELHO M. A. Z. (2007) (2007). "Production and characterization of a lipase from *Yarrowia lipolytica* in a multiphase reactor". *Process Biochemistry*.

2. TRINDADE, Joana R, MARTINS, Mara Guadalupe Freire, AMARAL, P. F. F., COELHO, Maria Alice Zarur, COUTINHO, João A P, MARRUCHO, Isabel M (2007). "Stability of Oil-in-Water Emulsions using a Biosurfactant from *Yarrowia lipolytica*". *Journal of Colloid and Interface Science.*

Publicação em Anais de Congressos (Trabalho completo)

1. BRÍGIDA, A. I. S., AMARAL, P. F., GONÇALVES, L. R. e COELHO M. A. Z. (2007) "Characterization of an Extracellular lipase from *Yarrowia lipolytica*", *Proceedings of European Congress of Chemical Engineering (ECCE-6)* Copenhagen, 16-20 September 2007.

2. AMARAL, P. F. F., MARTINS, Mara Guadalupe Freire, ROCHALEÃO, Maria Helena M, MARRUCHO, Isabel M, COELHO, Maria Alice Zarur, COUTINHO, João A P (2006). "EFFECT OF OXYGEN TRANSFER ON LIPASE PRODUCTION BY Yarrowia lipolytica IN THE PRESENCE OF PERFLUOROCHEMICALS". In*: XVI COBEQ Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, 2006, Santos.

3. AMARAL, P. F. F., MARTINS, Mara Guadalupe Freire, ROCHALEÃO, Maria Helena M, MARRUCHO, Isabel M, COELHO, Maria Alice Zarur, COUTINHO, João A P (2006). "Study of mass transfer performance in a multiphase bioreactor for lipase

production by *Yarrowia lipolytica*" In: *17th International Congress of Chemical and Process Engineering*, 2006, Praga.

4. AMARAL, P. F. F., COELHO, Maria Alice Zarur, PEIXOTO, Tathiana, ROCHALEÃO, Maria Helena M, COUTINHO, João A P. (2005). "Beneficial Effects of Perfluorocarbon in Yarrowia lipolytica Culture and Lipase Production" In: *2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering*, 2005, Rio de Janeiro.

4. AMARAL, P. F. F., COELHO, Maria Alice Zarur, MARTINS, Mara Guadalupe Freire, TIMMONS, Ana M Barros, COUTINHO, João A P. (2005). "Cell Wall Properties of *Y. lipolytica* and its Interaction with Perfluorochemicals", In: Enpromer 2005 - *2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering and 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering*, 2005, Rio de janeiro.

5. TRINDADE, Joana R, AMARAL, P. F. F., MARTINS, Mara Guadalupe Freire, TIMMONS, Ana M Barros, SILVA, José A Lopes da, COELHO, Maria Alice Zarur, MARRUCHO, Isabel M, COUTINHO, João A P (2005). "Characterization of Bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*", In: *ChemPor 2005 - 9th International Chemical Engineering Conference*, 2005, Coimbra.

6. LEHOCKY, Marian, AMARAL, P. F. F., STAHEL, P, COELHO, Maria Alice Zarur, TIMMONS, Ana M Barros, COUTINHO, João A P. (2005) "Interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and organosilicon polymer thin films deposited onto polycarbonate surface", In: *International Conference on Surfaces, Coatings and nanostructurated materials*, 2005, Aveiro.

7. TRINDADE, Joana R, MARTINS, Mara Guadalupe Freire, AMARAL, P. F. F., COELHO, Maria Alice Zarur, COUTINHO, João A P, MARRUCHO, Isabel M (2005). "Stability of oil-in-water emulsions using Yansan from *Yarrowia lipolytica*" In: *ChemPor 2005 - 9th International Chemical Engineering Conference*, 2005, Coimbra.

8. AMARAL, P. F. F., ROCHALEÃO, Maria Helena M, MARRUCHO, Isabel M, COUTINHO, João A P, COELHO, Maria Alice Zarur (2004). "The impact of perfluorochemical in yeast catalysed bioprocess" In: *XV COBEQ Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, 2004, Curitiba.

9. AMARAL, P. F. F., COELHO, Maria Alice Zarur, TAVARES, Ana Paula M, COUTINHO, João A P, MARRUCHO, Isabel M (2003). "Perfluorocarbons as an Agent for Improve Productivity in Yeast Cultivation" In: *20th European Symposium in Applied Thermodynamics*, 2003, Lahnstein.

10. AMARAL, P. F. F., COELHO, Maria Alice Zarur, TAVARES, Ana Paula M, MARRUCHO, Isabel M, COUTINHO, João A P (2003). "Use of Perfluorocarbons in yeast cultivation" In: *4th European Congress of Chemical Engineering (ECCE),* 2003, Granada.

Publicação em Anais de Congressos (Resumo)

1. AMARAL, P., MARTINS, M., MARRUCHO, I., ROCHA-LEÃO, M., COUTINHO, J. e COELHO, M. (2007). "Evaluation of mass transfer enhancement in lipase production by *Yarrowia lipolytica* in a multiphase system". *Book of Abstracts - European Congress of Chemical Engineering (ECCE-6)* Copenhagen, 16-20 September 2007

2. TRINDADE, Joana R, MARTINS, Mara Guadalupe Freire, AMARAL, P. F. F., COELHO, Maria Alice Zarur, COUTINHO, João A P, MARRUCHO, Isabel M (2006). "Study of emulsions stability using a biosurfactant from *Y. lipolytica* (IMUFRJ 50682)" In: *SIXTEENTH SYMPOSIUM ON THERMOPHYSICAL PROPERTIES*, 2006, Boulder.

3. LEHOCKY, Marian, AMARAL, P. F. F., STAHEL, P, COELHO, Maria Alice Zarur, TIMMONS, Ana M Barros, COUTINHO, João A P (2005). "Cell adhesion of yeasts on teflon-like thin films plasma deposited on synthetic polycarbonate substrates", In: *6th Advanced Course in Cell-Material Interactions at Molecular Level*, 2005, Porto.

4. AMARAL, P. F. F., MARTINS, Mara Guadalupe Freire, LEHOCKY, Marian, COELHO, Maria Alice Zarur, TIMMONS, Ana M Barros, COUTINHO, João A P (2005). "Cell wall properties of *Yarrowia lipolytica* and its interaction with hydrophobic compounds" In: II Jornadas CICECO, 2005, Aveiro.

5. LEHOCKY, Marian, TIMMONS, Ana M Barros, STAHEL, Pavel, AMARAL, P. F. F., COELHO, Maria Alice Zarur, COUTINHO, João A P (2005). "Cellular adhesion of *Yarrowia lipolytica* to plasma modified polycarbonate surfaces". In: *MATERIAIS 2005 XII Portuguese Materials Society Meeting III International Materials Symposium*, 2005, Aveiro.

6. LEHOCKY, Marian, AMARAL, P. F. F., STAHEL, P, COELHO, Maria Alice Zarur, TIMMONS, Ana M Barros, COUTINHO, João A P (2005). "Preparation and characterization of organosilicon thin films prepared by atmospheric pressure surface barrier discharge for selective adhesion of *Yarrowia lipolytica* yeast cells" In: *6th Advanced Course in Cell-Material Interactions at Molecular Level*, 2005, Porto.

7. AMARAL, P. F. F., COELHO, Maria Alice Zarur, ROCHALEÃO, Maria Helena M (2004). "Effect of PFC on both Lipase Production and Glycogen behaviour in *Yarrowia lipolytica* cells". In: *XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, 2004, Caxambu.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABED, M.A., SAXENA, A. e BOHIDAR, H.B. (2004). "Micellization of alpha-olefin sulfonate in aqueous solutions studied by turbidity, dynamic light scattering and viscosity measurements", *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v. 233 (1), pp. 181–187.

ADAMCZAK, M. e BEDNARSKI, W. (2004). "Enhanced activity of intracellular lipases from *Rhizomucor miehei* and *Yarrowia lipolytica* by immobilization on biomass support particles", *Proc. Biochem.*, v.39 (11), pp. 1347–1361.

ADAMCZAK, M. e BEDNARSKI, W. (1996). "Some factors affecting lipase production by yeasts and filamentous fungi", *Biotechnol. Lett.*, v.18 (10), pp. 1155-1160.

AGUEDO, M., WACHÉ, Y., BELIN, J.M. e TEIXEIRA, J.A. (2005). "Surface properties of *Yarrowia lipolytica* and their relevance to γ-decalactone formation from methyl ricinoleate", *Biotechnol. Lett.*, v. 27, pp. 417-422.

AGUEDO, M., WACHÉ, Y., COSTE, F., HUSSON, F. e BELIN, J.-M. (2004). "Impact of surfactants on the biotransformation of methyl ricionoleate into γ-decalactone by *Yarrowia lipolytica*", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.29 (1-6), pp. 31-36.

AGUEDO, M., WACHÉ, Y., MAZOYER, V., LE GRAND, A.S. e BELIN, J.-M. (2003). "Increased Electron Donor and Electron Acceptor Characters Enhance the Adhesion between Oil Droplets and Cells of *Yarrowia lipolytica* As Evaluated by a New Cytometric Assay", *J. Agric. Food Chem.,* v.51, pp. 3007-3011.

AKIN, N., AYDEMIR, S., KÇAK, C. e YILDIZ, M.A. (2003). "Changes of free fatty acid contents and sensory properties of white pickled cheese during ripening", *Food Chemistry*, v.80, pp. 77–83.

ALONSO, F.O.M. (2001). "Efeitos da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682)", Dissertação (Mestre em Ciências), Departamento de Fármacos – Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

ALONSO, F.O.M., OLIVEIRA, E.B.L, DELLAMORA-ORTIZ, G.M. e PEREIRA-MEIRELLES, F.V. (2005). "Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels". *Brazilian J. Chem. Eng.*, v. 22(1), pp. 9-18.

ALPER, E., WICHTENDAHL, B., DECKWER, W.D. (1980). "Gas absorption mechanism in catalytic slurry reactors", *Chemical Engineering Science*, v.35, pp. 217-222.

AMARAL, P.F.F. (2003). "Emprego de carreador de oxigênio na produção de lipase por *Yarrowia lipolytica"*, Dissertação (Mestre em Ciências), Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

ANDREISHCHEVA, E.N., SOARES, M.I.M. e ZVYAGIL'SKAYA, R.A. (1997). "Energy metabolism of *Candida (Yarrowia) lipolytica* yeast under nonstress and salinity stress conditions", *Russian J. of Plant Physiol.*, v.44, n.5, pp.568-574.

ARVINDEKAR, A.U. e PATIL, N.B. (2002). "Glycogen - a covalently linked component of the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae,* v. 19 (2), pp. 131-139.

AVEYARD, R. e HAYDON, D.A. (1973). "An introduction to the principles of surface chemistry", *Cambridge:Syndics of the Cambridge University Press*.

BAILEY, J.E. e OLLIS, D.F. (1986). "Biochemical Engineering Fundamentals", 2ª ed., Nova York, MacGraw-Hill Boock Co.

BARTH, G. e GAILLARDIN, C. (1997). "Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*", *FEMS Microbiol. Rev.*, v.19, pp.219-237.

BATTINO, R., RETTICH, T.R. e TOMINAGA, T. (1983). "The Solubility of Oxygen and Ozone in Liquids", *Journal of Physical and Chemical Reference Data,* v. 12(2), pp. 163-178.

BELLON-FONTAINE, M.-N., RAULT, J. e VAN OSS, C.J. (1996), "Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.71, pp. 147-153.

BLAKENEY AB, HARRIS PJ, HENRY RJ, Stone BA. (1983). "A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis", *Carbohyd. Res.*, v. 113, pp. 291–299.

BRADY, L., BRZOZOWSKI, A.M., DEREWENDA, Z.S., DODSON, E., DODSON, G., TOLLEY, S., TURKENBURG, J.P., CHRISTIANSEN, L., HUGEJENSEN, B., NORSKOV, L., THIM, L. e MENGE, U. (1990). "A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase" *Nature*, v. 343, pp. 767-770.

BRÍGIDA, A. I. S., AMARAL, P. F., GONÇALVES, L. R. e COELHO M. A. Z. (2007) "Characterization of an Extracellular lipase from *Yarrowia lipolytica*", *Proceedings of European Congress of Chemical Engineering (ECCE-6)* Copenhagen, 16-20 September 2007.

BRILMAN, D.W.F., GOLDSCHMIDT, M.J.V., VERSTEEG, G.F. e VAN SWAAIJ, W.P.M. (2000). "Heterogeneous mass transfer model for gas absorption in multiphase systems", *Chemical Engineering Science*, v.55, pp. 2793-2812.

BRUINING, W.J., JOOSTEN, G.E.H., BEENACKERS, A.A.C.M. e HOFMAN, H. (1986). "Enhancement of gas to water mass transfer rates by dispersed organic phase", *Chemical Engineering Science*, v.41, pp. 1873-1877.

BURKERT, J.F.M., MAUGERI, F. e RODRIGUES, M.I. (2004). "Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum sp.* using factorial design", *Bioresource Technology*, v.91, pp. 77–84.

BUSSCHER, H.J., VAN DE BELT-GRITTER, H.C. E VAN DER MEI, H.C. (1995). "Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrofobicity 1. Zeta potentials of hydrocarbon droplets". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 5, pp. 111-116.

BUSSCHER, H.J., WEERKAMP, A.H., VAN DER MEI, H.C., VAN PELT, A.W.J., DE JONG, H.P. e ARENDS J. (1984). "Measurement of the Surface Free Energy of Bacterial Cell Surfaces and its Relevance for Adhesion". *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 48(5), pp. 980-983.

CAMERON, D.R., COOPER, D.G. e NEUFELD, R.J. (1988). "The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier", *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 54 (6), pp. 1420-1425.

CASCAVAL, D., GALACTION, A-I., FOLESCU, E. e TURNEA, M. (2006). "Comparative study on the effects of *n*-dodecane addition on oxygen transfer in stirred bioreactors for simulated, bacterial and yeasts broths", *Biochem. Eng. J.,* v. 31, pp. 56–66.

CASTELLAR, M.R., TAIPA, M.A. e CABRAL, J.M.S. (1996). "Kinetic and stability characterization of *Chromobacterium viscosum* lipase and its comparison with *Pseudomonas glumae* lipase", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.61, pp.299-314.

CHANDLER, D., DAVEY, M.R., LOWE, K.C. e MULLIGAN, B.J. (1987). "Effects of emulsified perfluorochemicals on growth and ultrastructure of microbial cells in culture", *Biotechnol. Lett.*, v.9, n.3, pp.195-200.

CHEN, J., WEN, C. e CHEN, T. (1999). "Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*" *Biotechnol. Bioeng.*, v.62, n.3, pp.311-315.

CHO, M. H. e WANG, S. S., (1988). "Enhancement of oxygen transfer in hybridoma cell culture by using a perfluorocarbon as an oxygen carrier", *Biotechnol. Lett.*, v.10, n.12, pp.855-860.

CIAFARDINI, G., ZULLO, B.A. e IRIDE, A. (2006). "Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil", *Food Microbiology*, v. 23, pp. 60–67.

CIRIGLIANO, M.C. e CARMAN, G.M. (1984). "Isolation of a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*", *Appl. Environ. Microbiol.,* v.48 (4), pp. 747-750.

CIRIGLIANO, M.C. e CARMAN, G.M. (1985). "Purification and Characterization of Liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*", *Appl. Environ. Microbiol.,* v.50 (4), pp. 846-850.

CLARK, L.C., GOLLAN, F. (1966). "Survival of Mammals Breathing Organic Liquids Equilibrated with Oxygen at Atmospheric Pressure", *Science,* v. 152 (3730), p. 1755 – 1756.

COOPER, D.G. e PADDOCK, D.A. (1983). "*Torulopsis petrophilum* and surface activity", *Appl. Environ. Microbiol.,* v. 46 (6), pp. 1426-1429.

CORDOVA, J., NEMMAOUI, M., ISMAILI-ALAOUI, M. MORIN, A., ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M. e BENJILALI, B. (1998). "Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 5, pp. 75–78.

CORZO, G. e REVAH, S. (1999). "Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681", *Bioresource Technol.*, v.70, pp.173-180.

DALMAU, E., MONTESINOS, J.L., LOTTI, M., e CASAS, C. (1999). "Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*", *Enz. Microbiol. Technol.*, v.26, pp.657–663.

DAMIANO, D., e WANG, S.S. (1985). "Novel use of a perfluorocarbon for supplying oxygen to aerobic submerged cultures", *Biotechnol. Lett.*, v.7, pp.81-86.

DAS, T.R., BANDOPADHYAY, A., PARTHASARATHY, R., KUMAR, R. (1985). "Gas-liquid interfacial area in stirred vessels: the effect of an immiscible liquid phase", *Chemical Engineering Science*, v.40 (2), pp. 209-214.

DELLAMORA-ORTIZ, G.M., MARTINS, R.C., ROCHA, W.L. e DIAS, A.P. (1997) "Activity and stability of a *Rhizomucor miehei* lipase in hydrophobic media", *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 26, pp. 111-116.

DESAI, J.D. e BANAT, I.M. (1997) "Microbial production of surfactants and their commercial potential", *Micobiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 61 (1), pp. 47.

DESTAIN, J., ROBLAIN, D. e THONART, P. (1997). "Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*", *Biotechnology Letters,* v. 19(2) pp. 105–107.

DIAS, A.M.A., FREIRE, M.G., COUTINHO, J.A.P. e MARRUCHO, I.M. (2004). "Solubility of oxygen in liquid perfluorocarbons", *Fluid. Phase Equilib.*, v. 222-223, pp. 325-330.

DOMÍNGUEZ, A., DEIVE, F.J., SANROMÁN, M. A. e LONGO, M.A. (2003). "Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*", *J. Chem. Technol. Biotechnol.,* v. 78, pp. 1166–1170.

DRUET, D., ABBADI, N.E. e COMEAU, L.C. (1992). "Purification and characterization of the extracellular and cell-bound lipases from a *Penicillium cyclopium* variety", *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* v.37, pp. 745–749.

DUJON, B., SHERMAN, D., FISCHER, G., DURRENS, P., CASAREGOLA, S., LAFONTAINE, I., DE MONTIGNY, J., MARCK, C., NEUVE´GLISE, C., TALLA, E., GOFFARD, N., FRANGEUL, L., AIGLE, M., ANTHOUARD, V., BABOUR, A., BARBE, V., BARNAY, S., BLANCHIN, S., BECKERICH, J.M., BEYNE, E., BLEYKASTEN, C., BOISRAME, A., BOYER, J., CATTOLICO, L., CONFANIOLERI, F., DE DARUVAR, A., DESPONS, L., FABRE, E., FAIRHEAD, C., FERRY-DUMAZET, H., GROPPI, A., HANTRAYE, F., HENNEQUIN, R., JAUNIAUX, N., JOYET, P., KACHOURI, R., KERREST, A., KOSZUL, R.,

LEMAIRE, M., LESUR, I., MA, L., MULLER, H., NICAUD, J.M., NIKOLSKI, M., OZTAS, S., OZIER-KALOGEROPOULOS, O., PELLENZ, S., POTIER, S., RICHARD, G.F., STRAUB, M.L., SULEAU, A., SWENNEN, D., TEKAIA, F., WESOLOWSKI-LOUVEL, M., WESTHOF, E., WIRTH, B., ZENIOU-MEYER, M., ZIVANOVIC, I., BOLOTIN-FUKUHARA, M., THIERRY, A., BOUCHIER, C., CAUDRON, B., SCARPELLI, C., GAILLARDIN, C., WEISSENBACH, J., WINCKER, P. e SOUCIET, J.L. (2004). "Genome evolution in yeasts", *Nature,* v. 430, pp. 35–44.

DUMONT, E., ANDRÈS, Y. e LE CLOIREC, P. (2006). "Effect of organic solvents on oxygen mass transfer in multiphase systems: application to bioreactors in environmental protection", *Biochem. Eng. J.*, v. 30, pp. 245-252.

DUMONT, E. e DELMAS, H. (2003). "Mass transfer enhancement of gas absorption in oil-in-water systems: a review", *Chem. Eng. Proc.*, v.42, pp.419-438.

ELIBOL, M. (1997). "Culture of yeast in a perfluorocarbon/water system", *Biotechnol. Tech.*, v.11, n.8, pp.593-596.

ELIBOL, M. (1999). "Mass transfer characteristics of yeast fermentation broth in the presence of pluronic F-68", *Proc. Biochem.,* v.34, pp.557-561.

ELIBOL, M., e MAVITUNA, F. (1995). "Effect of perfluorodecalin as an oxygen carrier on actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2)", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.43, pp. 206-210.

ELIBOL, M., e MAVITUNA, F. (1996). "Use of perfluorocarbon for oxygen supply to immobilized *Streptomyces coelicolor* A3 (2)", *Proc. Biochem.*, v.31, n.5, pp. 507-512.

ELIBOL, M., e MAVITUNA, F. (1997). "Characteristcs of antibiotic production in a multiphase system", *Proc. Biochem.*, v.32, n.5, pp. 417-422.

ELIBOL, M. e MAVITUNA, F. (1999). "A remedy to oxygen limitation problem in antibiotic production: addition of perfluorocarbon", *Biochem. Eng. J.*, v.3, pp.1-7.

ELIBOL, M. e OZER, D. (2000). "Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*", *Proc. Biochem.* v.36, pp.325-329.

ELIBOL, M. e OZER, D. (2002). "Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*", *Proc. Biochem.* v.38, pp.367-372.

ELLAIAH, P., PRABHAKAR, T., RAMAKRISHNA, B.,THAER TALEB, A. eADINARAYANA, K. (2004). "Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger"*, *Proc. Biochem.*, v.39, pp. 525–528.

ERICKSON, L.E., NAKAHARA, T. e PROKOP, A. (1975). "Growth in cultures with 2 liquid-phases – hydrocarbon uptake and transport", *Process Biochem.,* v.10 (5), pp.9.

FLORES, C-L., RODRÍGUEZ, C., PETIT, T. e GANCEDO, C. (2000). "Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts", *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 24, n.4, pp.507-529.

FICKERS, P, FUDALEJ, F., JEAN-MARC NICAUD, J.M., DESTAIN, J. e THONART, P.. (2005). "Selection of new over-producing derivatives for the improvement of extracellular lipase production by the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*", *Journal of Biotechnology*, v. 115, pp. 379–386.

FICKERS, P., NICAUD, J.M., GAILLARDIN, C., DESTAIN, J. e THONART, P. (2004). "Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*", *Journal of Applied Microbiology*, v. 96, pp. 742–749.

FICKERS, P*.,* ONGENA, M., DESTAIN, J., WEEKERS, F. e THONART, P. (2006). "Production and down-stream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, pp. 756–759

FREIRE, M.G., DIAS, A.M.A., COELHO, M.A.Z., COUTINHO, J.A.P. e MARRUCHO, I.M. (2005) "Aging mechanisms of perfluorocarbon emulsions using image analysis", *J. Colloid Interface Sci.,* v. 286, pp. 224-232.

FRIEDENTHAL, M., EPSTEIN, A. e PASSERON, S. *et al.*, (1974). "Effect of potassium cyanide, glucose and anaerobiosis on morphogenesis of *Mucor rouxii*", *J. Gen. Microbiol.*, v.82, pp.15-24 *apud* SZABO, R. (1999). "Dimorphism in *Yarrowia lipolytica:* Filament formation is suppressed by nitrogen starvation and inhibition of respiration", *Folia Microbiol.* v.44, n.1, pp.19-24.

GALACTION, A-I., CASCAVAL, D., ONISCU, C. e TURNEA, M. (2004). "Prediction of oxygen transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths", *Biochem. Eng. J.,* v. 20, pp. 85-94.

GALACTION, A-I., CASCAVAL, D., TURNEA, M. e FOLESCU, E. (2005). "Enhacement of oxygen mass transfer in stirred bioreactors using oxygen-vectors. 2. *Propionibacterium shermanii* broths", *Bioprocess Biosyst.. Eng..* v. 27, pp. 263-271.

GHOMMIDH, C., CUTAYAR, J.M. e NAVARRO, J.M. (1986). "Continuous production of vinegar, I. Research strategy", *Biotechnol. Lett.*, v.8, n.1, pp.13-18.

GILBERT, E.J., DROZD, J.W. e JONES, C.W. (1991). "Physiological regulation and optimization of lipase activity in Pseudomonas aeruginosa EF2", *J. Gen. Microbiol.*, v. 137(9), pp. 2215-21.

GIMENO, C.J., LJUNGDAHL, P.O., STYLES, C.A. e FINK, G.R. (1992). "Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS", *Cell*, v. 68, pp.1077-1090.

GOMBERT, A.K., PINTO, A.L., CASTILHO, L.R. e FREIRE, D.M.G. (1999). "Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate", *Process Biochemistry*, v. 35, pp. 85–90.

GORDILLO, M.A., MONTESINOS, J.L., CASAS, C., VALERO, F., LAFUENTE, J. e SOLÀ, C. (1998). "Improving lipase production from *Candida rugosa* by a biochemical engineering approach", *Chem. Phys. Lipids*., v.93 (1-2), pp. 131-42

GUERZONI, M.E., LANCIOTTI, R., VANNINI, L., GALGANO, F., FAVATI, F., GARDINI, F. e SUZZI, G. (2001). "Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions", *Int. J. Food Microbiol.*, v.69, pp.79-89.

GULATI, R., SAXENA, R.K. e GUPTA, R. (2000). "Fermentation and downstream processing of lipase from *Aspergillus terreus*" *Proc. Biochem*., v.36, pp.149-155.

GUTIERREZ, J.R. e ERICKSON, L.E. (1977). "Hydrocarbon Uptake in Hydrocarbon Fermentations", *Biotechnol. Bioeng.*, v.19, pp. 1331-1349.

GÜVENÇ, A., KAPUCU, N. e MEHMETOGÙLU, U. (2002). "The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system", *Proc. Biochem.,* v.38, pp.379-386.

HADEBALL, W. (1991). "Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*: I. Lipases from yeasts (Review)", *Acta Biotechnol.*, v.11, pp.159-167.

HAEFNER, F. e NORIN, T. (1999). "Molecular Modelling of Lipase Catalysed Reactions. Prediction of Enantioselectivities", *Chem. Pharm. Bull.,* v.47(5), pp.591-600.

HAEGLER, A.N. e MENDONÇA-HAEGLER, L.C. (1981). "Yeast from marine and astuarine waters with different levels of pollution in the State of Rio de Janeiro, Brazil", *Appl. Environ. Microbiol*., v.41, n.1, pp.173-178.

HANSSAN, I.T.M, ROBINSON, C.W. (1977). "Oxygen transfer in mechanically agitated systems containing dispersed hidrocarbon", *Biotechnol. Bioeng*., v.19, pp. 661-682.

HA, S.H., LAN, M.N., LEE, S.H., HWANG, S.M. e KOO, Y.M. (2007). "Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids", Enzyme and Microbial Technology, v. 41, pp. 480–483.

HEDRICH, H.C. e SPENER, F. (1998). "Large-scale purification, enzymic characterization, and crystallization of the lipase from *Geotrichum candidum*" *Enz. Microb. Technol*., v.13, pp.840-847.

HEMACHANDER, C. e PUVANAKRISHNAN, R. (2000). "Lipase from *Ralstonia pickettii* as an additive in laundry detergent formulations", *Proc. Biochem.,* v.35, pp.809–814.

HENRIQUES, M., GASPARETTO, K., AZEREDO, J. e OLIVEIRA, R. (2002) "Experimental methodology to quantify *Candida albicans* cell surface hydrophobicity", *Biotechnol. Lett.*, v. 24 (13), pp. 1111-1115.

HERMANSSON, M. (1999). "The DLVO theory in microbial adhesion", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* v. 14, pp. 105–119

HINES, A. L. e MADDOX, R. N. (1985). "Mass Transfer: Fundamentals and Applications", *Prentice-Hall*, Englewood, U.S.A.

HO, C.S., JU, L-K. e BADDOUR, R.F. (1990). "Enhancing penicillin fermentations by increased oxygen solubility through the addition of *n*-hexadecane", *Biotechnol. Bioeng.*, v.36, pp1110-1118.

HUGHMARK, G.A. (1980). "Power requirements and interfacial area in gas-liquid turbine agitated systems", *Ind. Eng. Chem. Proc. Des. Dev*., v. 10, pp. 638-641.

HUMPHREY, A.E. e TAGUCHI, H. (1966). "Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems", *J. Ferm. Technol. (Japan)*, v.44 (12), pp. 881-889.

ISMAIL, S.A.S., DEAK, T., ABD EL-RAHMAN, H.A., YASSIEN, M.A.M. e BEUCHAT, L.R. (2001). "Effectiveness of immersion treatments with acids, trisodium phosphate, and herb decoctions in reducing populations of *Yarrowia lipolytica* and naturally occurring aerobic microorganisms on raw chicken**",** *Int. J. Food Microbiol.,* v.64 (1-2), pp. 13-19.

ISO, M., CHEN, B., EGUCHI, M., KUDO T. e SHRESTHA, S. (2001). "Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.16, pp.53–58.

JÄÄSKELÄINEN, S., VERMA, C.S., HUBBARD, R.E., LINKO, P. e CAVES, L.S.D. (1998). "Conformational change in the activation of lipase: An analysis in terms of low-frequency normal modes", *Prot. Science,* v.7, pp. 1359-1367.

JAEGER, K.E., DIJKSTRA, B.W. e REETZ, M.T. (1999). "BacterialBiocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases", *Annu. Rev. Microbiol.,* v.53, pp. 315-351.

JAEGER, K.E. e EGGERT, T. (2002). "Lipases for biotechnology", *Curr. Opin. Biotechnol.*, v.13, pp.390–397.

JAEGER, K.E. e REETZ, M.T. (1998). "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology", *Tibtech*, v.16, pp.396–403.

JAVAHERI, M., JENNEMAN, G.E., MCINNERNEY, M.J. e KNAPP, R.M. (1985). "Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2", *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 50 (3), pp. 698–700.

JIA, S., LI, P., PARK, Y., OKABE, M. (1996). "Enhanced Oxygen Transfer in Tower Biorreactor on Addition of Liquid Hydrocarbons", *J. Ferment. Bioeng.,* v.82 (2), pp.191-193.

JIA, S., WANG, M., KAHAR, P., PARK, Y., OKABE, M. (1997). "Enhancement of Yeast Fermentation by Addition of Oxygen Vectors in Air-Lift Bioreactor", *J. Ferment. Bioeng.,* v.84 (2), pp.176-178.

JIMÉNEZ-BREMONT, J.F., RUIZ-HERRERA, J. e DOMINGUEZ, A. (2001). "Disruption of gene YlODC reveals absolute requirement of polyamines for mycelial development in *Yarrowia lipolytica*", *FEMS Yeast Research*, v.1, pp.195-204.

JU, L-K., LEE, J.F. e ARMIGER, W.B. (1991). "Enhancing oxygen transfer in bioreactors by perfluorocarbon emulsions", *Biotechnol. Prog.*, v.7, pp.323-329.

JUNG, F., CAMMAROTA, M.C. e FREIRE, D.M.G. (2002). "Impact of enzymatic pre-hydrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily wastewaters", *Biotechnology Letters*, v. 24 (21), pp. 1797-1802.

JUNKER, B.H., HATTON, T.A. e WANG, D.I.C. (1990). "Oxygen transfer enhancement in aqueous/perfluorocarbon fermentation systems: I. Experimental observations", *Biotechnol. Bioeng.*, v.35, pp.578-585.

KAEPPELI, O. e FIECHTER, A. (1976). "The mode ofinteractions between the substrate and cell surface of the hydrocarbon-utilizing yeast *Candida tropicalis*", *Biotechnol. Bioeng.,* v.18, pp. 967-974.

KAMINI, N.R. MALA, J.G.S. e PUVANAKRISHNAN, R. (1998). "Lipase production from *Aspergillus niger,* by solid-state fermentation using gingelly oil cake", *Process Biochemistry,* v. 33(5), pp. 505-511.

KAMZOLOVA, S.V., SHISHKANOVA, N.V., MORGUNOV, I.G. e FINOGENOVA, T.V. (2003). "Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*", *FEMS Yeast Research*, v.1528, pp.1-6.

KAWASSE, F.M. (2001). "Interação lipase-glicogênio e dimorfismo celular sob condições de estresse térmico e oxidativo em *Yarrowia lipolytica*", Dissertação (Mestre em Ciências), Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

KAWASSE, F.M, AMARAL, P.F., ROCHA-LEÃO, M.H.M., AMARAL, A.L., FERREIRA, E.C. e COELHO, M.A.Z. (2003). "Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing", *Bioprocess Biosyst. Eng.*, v.25, pp.371-375.

KIM, B.S. e HOU, C. T. (2006). "Production of lipase by high cell density fed-batch culture of *Cnadida cylindracea*", *Bioprocess Biosyst. Eng.*, v.29, pp. 59-64.

KOLLÁR, R., REINHOLD, B.B., PETRÁKOVÁ, E., YEH, H.J.C., ASHWELL, G., DRGONOVÁ, J., KAPTEYN, J.C., KLIS, F.M. e CABIB, E. (1997). "Architecture of the Yeast Cell Wall – Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->)3-glucan, and chitin", *J. Biol. Chem.,* v. 272, pp. 17762-17775.

LANG. D.A. e DIJKSTRA, B.W. (1998). "Structural investigations of the regio- and enantioselectivity of lipases", *Chem. Phys. Lipids,* v.93, pp.115–122.

LEGIER, V. e COMEAU, L.C. (1992). "Continuous synthesis of esters by cell-bound fungal lipases in an organic solvent", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.37, pp. 732–736.

LEHOCKÝ, M., DRNOVSKÁ, H., LAPČÍKOVÁ, B., BARROS-TIMMONS, A.M., TRINDADE, T., ZEMBALA, M. e LAPČÍK, L. (2003). "Plasma surface modification of polyethylene", *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Aspects,* v. 222, pp. 125-131.

LEWIS, W.K. e WHITMAN, W.G. (1924). "Principles of Gas Absorption", *Ind. Eng. Chem.*, v. 16, 1215.

LI, C.-Y., CHENG, C.-Y. e CHEN, T.-L., (2001). "Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase using Tween 80 as the carbon source", *Enz. Microbiol. Technol.*, v.29, pp.258–263.

LI, C.-Y., CHENG, C.-Y. e CHEN, T.-L. (2004). "Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source", *Biochemical Engineering Journal*, v.19, pp. 25–31.

LI, L., DU, W., LIU, D., WANG, L. e LI, Z. (2006). "Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 43, pp. 58–62.

LIN, E-S. e KO, H-C. (2005). "Glucose stimulates production of the alkaline-thermostable lipase of the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea*", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, pp. 261–265.

LIN, S.C. (1996). "Biosurfactants: Recent advances", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 66 (2), pp. 109-120.

LONG, K., GHAZALI, H.M., ARIFF, A. e BUCKE, C. (1997). "Acidolysis of several vegetable oils by mycelium-bound lipase of *Aspergillus flavus* Link", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v.74, pp. 1121–1128.

LOTTI, M., MONTICELLI, S., MONTESINOS, J.L., BROCCA, S., VALERO, F. e LAFUENTE, J. (1998). "Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase", *Chem. Phys. Lipids,* v.93, pp.143–8 *apud* SHARMA, R., CHISTI, Y. e BANERJEE, U.C. (2001). "Research review paper production, purification, characterization, and applications of lipases", *Biotechnology Advances*, v.19, pp.627–662.

LOWE, K. C., DAVEY, M. R. e POWER, J. B. (1998). "Perfluorochemicals: their applications and benefits to cell culture", *Tibtech*, v. 16, pp.272-277.

LOWE, K. C., (2002). "Perfluorochemical respiratory gas carriers: benefits to cell culture systems", *J. Fluorine Chemistry*, v. 118, pp.19-26.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N, J., FARR, A. L. e RANDALL, R. J. (1951) "Protein measurement with the folin phenol reagent", *Journal of Biological Chemystry*, v. 193, pp. 265-275.

LUKONDEH, T., ASHBOLT, N.J. e ROGERS, P.L. (2003) "Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 grown on a lactose-based medium as a source of a natural bioemulsifier", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 30 (12), pp. 715-720.

MADZAK, C., GAILLARDIN, C. E BECKERICH, J.-M. (2004). "Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review", *Journal of Biotechnology*, v.109 (1-2), pp. 63-81.

MATH WORKS INC., THE. (1997) "Image processing toolbox, for use with Matlab", *version* 2.

MACMILLAN, J.D., WANG, D.I.C. (1990). "Mechanisms of oxygen transfer enhancement during submerged cultivations in perfluorochemical-in-water dispersions", *Ann. NY Acad. Sci.*, v.589, pp.283-300 *apud* ROLS, J.L., CONDORET, J.S., FONADE, C. e GOMA, G. (1990). "Mechanism of enhanced oxygen transfer in fermentation using emulsified oxygen-vectors", *Biotechnol. Bioeng.*, v.35, pp. 427-435.

MARCHETTI, J.M., MIGUEL, V.U. e ERRAZU, A.F. (2007). "Possible methods for biodiesel production", Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 11, pp. 1300–1311.

MARTINS, T.S.M. (2001). "Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682)", Dissertação (Mestre em Ciências), Departamento de Fármacos – Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

MATSUMOTO, S. e KURODA, Y. (2002). "Perfluorocarbon for organ preservation before transplantantion", *Transplantation*, v.74, n.12, pp.1804-1809.

MCNIVEN, M.A., GALLANT, R.K. e RICHARDSON, G.F., (1993). "Fresh storage of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) semen using a non-aqueous medium", *Aquaculture,* v.109, pp.71-82 *apud* LOWE, K. C., DAVEY, M. R. e POWER, J. B.

(1998). "Perfluorochemicals: their applications and benefits to cell culture", *Tibtech*, v.16, pp.272-277.

MORRISON, R.T. e BOYD, R.N. (1992). "Organic Chemistry", Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 6ªed., pp.1119-1137.

MOZES, N. e ROUXHET, P.G. (1987). "Methods for measuring hydrophobicity of microorganisms", *J. Microbiol. Meth.,* v.6, pp. 99-112.

MULLER, S., SANDAL, T., KAMP-HANSEN, P. e DALBOGE, H. (1998). "Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisia*e, *Hansenula polymorph*a, *Kluyveromyces lacti*s, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytic*a. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytic*a", *Yeast*, v.14, pp. 1267-1283.

MURALIDHAR, R.V., CHIRUMAMILA, R.R., MARCHANT, R. e NIGAM, P. (2001). "A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources", *Biochem. Eng. J.*, v.9, pp.17–23.

NICAUD, J-M., FABRE, E. e GAILLARDIN, C. (1989). "Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker", *Curr. Genet.*, v.16, pp.253-260.

NICAUD, J-M., MADZAK, C., BROEK, P.V.D, GYSLER, C., DUBOC, P., NIEDERBERGER, P. e GAILLARDIN, C. (2002). "Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*", *FEMS Yeast Research*, v.2, n.3, pp.371-379.

NIELSEN, D.R., DAUGULIS, A.J. e MCLELLAN, P.J. (2003). "A Novel Method of Simulating Oxygen Mass Transfer in Two-Phase Partitioning Bioreactors", *Biotechnol. Bioeng.*, v. 83 (6), pp. 735-742.

NIELSEN, J. e VILLADSEN, J. (1994). "Bioreaction engineering principles", *New York: Plenum Press*. 540 p.

NOVAK, Z., HABULIN, M., KRMELJ, V. e KNEZ, Ž. (2003). "Silica aerogels as supports for lipase catalyzed esterifications at sub- and supercritical conditions", *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 27 (2), pp. 169-178.

NOVOTNY, C., DOLEZALOVA, L., MUSIL, P., e NOVAK, M. (1988). "The production of lipases by some *Candida* and *Yarrowia* yeasts", *J. Basic Microbiol.*, v.28, pp.221-227.

NOVOTNY, C. e DOLEZALOVA, L., (1993). "Effect of lipids and detergents on the production and solubilization of extracelilar lipase in *Yarrowia lipolytica*", *Folia Microbiol.*, v.38, n.1, pp.49-54.

OKAZAKI, S., KAMIYA, N., GOTO, M. e NAKASHIO, F. (1997). "Purification and characterization of a novel lipolytic enzyme from *Aspergillus oryzae*", *J. Ferment. Bioeng.*, v.78, n.6, pp.413-419.

OSÓRIO, N.M., FERREIRA-DIAS, S., GUSMÃO, J.H. e FONSECA, M.M.R. (2001). "Response surface modelling of the production of v-3 polyunsaturated fatty acids-enriched fats by a commercial immobilized lipase", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* v.11, pp.677–686.

OTA, Y., GOMI, K., KATO, S., SUGIURA, T. e MINODA, Y. (1982). "Purification and some properties of cell-bond lipase from *Saccharomycopsis lipolytica", Agr. Biol. Chem.*, v.46, n.12, pp.2885-2893.

OTA, Y., SUZUKI, M. & YAMADA, K. (1968). "Lipids and related substances inducing the lipase production by *Candida paralipolytica", Agr. Biol. Chem.*, v.32, n.3, pp.390-391.

PAREILLEUX, A. (1979). "Hydrocarbon assimilation by *Candida lipolytica*: Formation of a biosurfactant; Effects on respiratory activity and growth", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 8, p. 91-101.

PELED, N. e KRENZ, M.C. (1981). "A new assay of microbial lipases with emulsified trioleoyl glicerol", *Anal. Biochem.*, v.112, pp.219-222.

PEREIRA-MEIRELLES, F.V. (1997). "Produção de lipases por *Yarrowia lipolytica*", Dissertação (Doutorado em Ciências), IQ – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

PEREIRA-MEIRELLES, F.V., ROCHA-LEÃO, M.H. e SANT'ANNA, G.L., 1997. "A stable lipase from *Candida lipolytica* – cultivation conditions and crude enzyme characteristics", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.63-65, pp.73-85.

PEREIRA-MEIRELLES, F.V., ROCHA-LEÃO, M.H. e SANT'ANNA, G.L. (2000). "Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells", *Biotechnol. Lett.*, v.22, n.1, pp.71-75.

PIGNEDE, G., WANG, H.-J., FUDALEJ, F., SEMAN, M., GAILLARDIN, C. e NICAUD, J.M. (2000). "Autocloning and Amplification of *LIP2* in *Yarrowia lipolytica*, *Appl. Environ. Microbiol.,* v. 66(8), pp. 3283-3289.

POKORNY, D., FRIEDRICH, J. e CIMERMAN, A. (1994). "Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*", *Biotechnol Lett*, v. 16, pp. 363–66.

POUDEROYEN, G.V., THORSTEN, E., JAEGER, K.E. e DIJKSTRA, B.W. (2001). "The Crystal Structure of *Bacillus subtilis* Lipase: A Minimal a/b Hydrolase Fold Enzyme", *J. Mol. Biol.*, v. 309, pp. 215-226.

PUTHLI, M.S., RATHOD, V.K. e PANDIT, A.B. (2005). "Optimization of lipase production in a triple impeller bioreactor", *Biochemical Engineering Journal*, v. 27, pp. 287–294.

QUEIMADA, A.J., CAÇO, A.I., MARRUCHO, I.M., e COUTINHO, J.A.P. (2005). "Surface tension of *n*-decane binary and ternary mixtures with *n*-eicosane, *n*-docosane and *n*-tetracosane", *J. Chem. Eng. Data.*, v. 50, pp. 1043-1046.

RAMON, A.M., MONTEIRO, M., SENTANDREU, R. e VALENTIN, E. (1999). "*Yarrowia lipolytica* cell wall architecture: interaction of Ywp1, a mycelial protein, with other wall components and the effect of its depletion", *Res. Microbiol.*, v. 150(2), pp. 95-103.

RATLEDGE, C. e EVANS, C.T. (1989). "Lipids and their metabolism". In: The yeast – metabolism and physiology of yeasts. 2nd Ed. A.H. Rose and J.S. Harrison v.3 pp.367-455 *apud* PEREIRA-MEIRELLES, F.V. (1997). "Produção de lipases por *Yarrowia lipolytica*", Dissertação (Doutorado em Ciências), IQ – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

RIESS, J.G. (2005). "Understanding the fundamentals of perfluorocarbons and perfluorocarbon emulsions relevant to in vivo oxygen delivery. Artificial Cells", *Blood Substitutes, and Biotechnology*, v. 33, pp. 47–63

RIET, K.V. (1979). "Review of measuring methods and results in nonviscous gas-liquid mass transfer in stieed vessels", *Ind. Eng. Chem Process Des. Dev.*, v.18, n.3, pp.357-364.

RIJNAARTS, H.H.M., NORDE, W., LYKLEMA, J. e ZEHNDER, A.J.B. (1995a). "The isoelectric point of bacteria as an indicator for the presence of cell surface polymers that inhibit adhesion", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* v. 4, pp. 191-197.

RIJNAARTS, H.H.M., NORDE, W., BOUWER, E.J., LYKLEMA, J. e ZEHNDER, A.J.B (1995b). "Reversibility and mechanism of bacterial adhesion", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* v. 4, pp. 5–22.

RIJNAARTS, H.H.M., NORDE, W., BOUWER, E.J., LYKLEMA, J. e ZEHNDER, A.J.B (1996). "Bacterial Deposition in Porous Media Related to the Clean Bed Collision Efficiency and to Substratum Blocking by Attached Cells", *Environ. Sci. Technol.,* v. 30(10), pp. 2869-2876.

ROLS, J.L., CONDORET, J.S., FONADE, C. e GOMA, G. (1990). "Mechanism of enhanced oxygen transfer in fermentation using emulsified oxygen-vectors", *Biotechnol. Bioeng.*, v.35, pp. 427-435.

ROLS, J.L., CONDORET, J.S., FONADE, C. e GOMA, G. (1991). "Modeling of oxygen transfer in water through emulsified organic liquids", *Chemical Engineering Science*, v.46 (7), pp. 1869-1873.

ROSA, D.R., CAMMAROTA, M.C. e FREIRE, D.M.G. (2002). "Production and Utilization of a Novel Solid Enzymatic Preparation Produced by Penicillium restrictum in Activated Sludge Systems Treating Wastewater with High Levels of Oil and Grease", *Environmental Engineering Science*, v. 23(5), pp. 814-823.

ROSENBERG, M. (1981). "Bacterial Adherence to Polystyrene: a Replica Method of Screening for Bacterial Hydrofobicity", *Applied Env. Microbiol*, v. 42 (2), pp. 375-377.

ROSENBERG, M. (1991). "Basic and applied aspects of microbial adhesion at the hydrocarbon-water interface", *Crit, Rev. Microbiol.,* v.18, 159-173.

ROXBURGH, J.M., SPENCER , J.F.T. e SALLANS, H. R. (1954). "Submerged culture fermentation: factors affecting the production of ustilagic acid by ustilago zeae", *Agric. Food Chem.*, v.2, n.22**,** pp.1121-1124.

SAR, N. e ROSENBERG, E. (1983). "Emulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* strains", *Curr. Microbiol*., v. 9 (6), pp. 309–314.

SARUBBO, L. A., FARIAS, C.B.B. e CAMPOS-TAKAKI, G. M. (2007). "Co-Utilization of Canola Oil and Glucose on the Production of a Surfactant by *Candida lipolytica*", *Current Microbiology*, v. 54(1), p. 68-73.

SARUBBO, L. A., MARÇAL, M. C., NEVES, M. L. C., SILVA, M. P., PORTO, A. L. F. e CAMPOS-TAKAKI, G. M. (2001). "Bioemulsifier Production in Batch Culture

Using Glucose as Carbon Source by *Candida lipolytica*", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.95, p. 59-68.

SCHIMIDELL, W., *et al*. (2001), "Biotecnologia Industrial – Volume 2", *Editora Edgard Blücher*, 1ª ed., São Paulo, Brasil.

SCIOLI, C. e VOLLARO, L. (1997). "The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters", *Water Research,* v.31, n.10, pp.2520-2524.

SEIDER, W.D., SEADER, J.D. e LEWIN, D.R. (2003). "Product and process design principles: synthesis, analysis, and evaluation", *John Wiley and Sons, Inc.* , 2ª ed.

SELVENDRAN RR, MARCH JF, RING, S.G. (1979). "Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber", *Anal. Biochem.*, v. 96(2), pp. 282–292.

SHARMA, R., CHISTI, Y. e BANERJEE, U.C., (2001). "Research review paper production, purification, characterization, and applications of lipases", *Biotechnology Advances*, v.19, pp.627–662.

SJOBLOM, J. (1991). "Emulsion and Emulsion Stability", Surfactant Science Series, *Marcel Dekker*, New York.

SZABO, R. (1999). "Dimorphism in *Yarrowia lipolytica:* filament formation is suppressed by nitrogen starvation and inhibition of respiration", *Folia Microbiol.* v.44, n.1, pp.19-24.

SZABO, R. e ŠTOFANÍKOVÁ, V. (2002). "Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formaton and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*", *FEMS Microbiol. Letters*, v.206, pp.45-50.

SZTAJER, H., LÜNSDORF, H. ERMANN, H., MENGE, U. e SCHMID, R. (1992). "Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*", *Biochim. Biophys. Acta*, v.1124, pp.253-261.

SZTAJER, H., MALISZEWSKA, I. e WIECZOREK, J. (1988). "Production of exogenous lipase by bacteria, fungi and actinomycetes", *Enzyme Microb. Technol.,* v.10, pp.492–497.

TAE-HYUN, K., OH, Y-S. e KIM, S-J. (2000) "The Possible Involvement of the Cell Surface in Alinphatic Hydrocarbon Utilization by an Oil-Degrading Yeast, *Yarrowia lipolytica* 180", *J. Microbiol. Biotechnol.,* v. 10 (3), pp. 333-337.

TAN, T., ZHANG, M., WANG, B., YING, C. e DENG, L. (2003). "Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation", *Proc. Biochem.*, v.39, pp.459-465.

TAYLOR, P. (1995) "Ostwald ripening in emulsions", *Colloids and Surf. A*, v. 99, pp. 175-185.

THURSTON, R.J., ROGOFF, M.S., SCOTT, T.R. e KORN, N. (1993). "Research note: effects of perfluorochemical diluent additives on fertilizing capacity of turkey semen", *Poult. Sci*. v. 72(3), pp. 598-602.

TORABIZADEH, H., SHOJAOSADATI, S.A. e TEHRANI, H.A. (1996) "Preparation and Characterization of Bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* and its Application in Food Products", *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, v. 29 (8), pp. 734-737.

TSUGAWA, R., NAKASE, T., KOYABASHI, T., YAMASHITA, K. e OKUMURA, S. (1969). "Fermentation of *n*-paraffins by yeast. Part III. A-Ketoglutarate productivity of various yeasts", *Agr. Biol. Chem.*, v.33, pp.929-938.

UNDURRAGA, D., MARKOVITS, A. e ERAZO, S. (2001). "Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction", *Proc. Biochem.*, v.36, pp.933–939.

VAKHLU, J. e AVNEET, K. (2006). "Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning", *Electronic Journal of Biotechnology* [online], v. 9(1).

VAN DEN TEMPEL, M. (1953). *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, v. 72, pp. 433.

VAN DER MEI, H.C., BOS, R. e BUSSCHER, H.J. (1998). "A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* v.11, pp. 213–221.

VAN DER MEI, H.C., VAN DE BELT-GRITTER, B. e BUSSCHER, H.J. (1995). "Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity 2. Adhesion mechanisms", *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, v.5, pp. 117-126.

VAN EDE, C.J., VAN HOUTEN, R. e BEENACKERS, A.A.C.M., (1995). "Enhancement of gas to water mass transfer rates by a dispersed organic phase", *Chemical Engineering Science*, v.50, pp. 2911-2922.

VAN OSS, C.J. (1995). "Hydrophobicity of biosurfaces- origin, quantitative determination and interaction energies", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* v. 5, pp. 9l-110

VAN OSS, C.J. (1997). "Hydrophobicity and hydrophilicity of biosurfaces", *Curr. Opin. Coll. Interf. Sci.,* v. 2, pp. 503-512

VAN SONSBEEK, H.M., BEEFTINK, H.H. e TRAMPER, J. (1993). "Two-liquid-phase bioreactors", *Enzyme Microb. Technol.*, v.15, pp. 722-729.

VIDAL, A.P., AMARAL, P.F.F., ROCHA-LEÃO, M.H.M., COUTINHO, J.A.P. e COELHO, M.A.Z. (2007). "Influência da presença de surfactantes em sistemas multifásicos para produção de lipase por diferentes linhagens de *Yarrowia lipolytica*", In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, Curitiba, 2007.

WANG, L., DU, W., LIU, D., LI, L. e DAÍ, N. (2006). "Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in *tert*-butanol system", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* v. 43, pp. 29–32.

WANG, L., LI, H., HE, J., HE, X., LI, W., WANG, Y. e LI, H. (1977) "Structure analysis of teflon-like thin films synthesized by ion beam sputtering deposition", *Materials Letters*, v. 33, pp. 77-78.

WARDROP, J., DAVEY, M.R., POWER, J.B. e LOWE, K.C. (1997a). "Beneficial effects of oxygenated fluorocarbon on the *in vitro* culture of protoplasts and cell electrofusion products", *Art. Cells, Blood Subs., and Immob. Biotech*., v.25, n.5, pp.481-486.

WARDROP, J., LOWE, K.C., DAVEY, M.R. e MARCHANT, R. (1997b). "Carbon dioxide-gassed fluorocarbon enhances micropropagation of rose (*Rosa chinesis* Jacq.)", *Plant Cell Reports*, v.17, pp.17-21.

WASANASATHIAN, A., PENG, C-A. (2001). "Enhancement of microalgal growth by using perfluorocarbon as oxygen carrier", *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, v. 29 (1), p. 47 – 55.

WATANABE, N., OTA, Y., MINODA, Y. e YAMADA, K. (1977). "Isolation and identification of alkaline lipase producing microrganisms; cultural conditions and some properties of crude enzyme", *Agr. Biol. Chem.*, v.41, pp.1353-1358.

WEI, D., ZHANG, L.-y. e SONG, Q. (2004). "Studies on a novel carbon source and cosolvent for lipase production by *Candida rugosa*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 31, pp. 133-136.

WHITAKER, J.R. (1972). "Principals of enzymology for the food sciences", In: Food science – A series of monographs, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 481-501.

WINKLER, F.K., DARCY, A. e HUNZIKER, W. (1990) "Structure of human pancreatic lipase" *Nature*, v.343, pp. 771-774.

WINKLER, U.K. e STUCKMANN, M. (1979). "Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*", *J. Bacteriol.*, v.138, pp.663-670.

ZINJARDE, S.S., CHINNATHAMBI, S., LACHKE, A.H. e PANT, A. (1997). "Isolation of an emulsifier from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 using a modified mini isoeletric focusing unit", *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 24, pp. 117-121

ZINJARDE, S. S.; PANT, A.; (2002). "Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589", *J. Basic Microbiol.*, v. 42, p. 67-73.