

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

JULIANA RABELO DE SOUSA

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DA GLICERINA OBTIDA DA
PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

FORTALEZA – CE

2008

JULIANA RABELO DE SOUSA

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DA GLICERINA OBTIDA DA
PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Rocha Barros Gonçalves

FORTALEZA – CE

2008

S697p Sousa, Juliana Rabelo de
Produção de biossurfactantes a partir da glicerina obtida da
produção de biodiesel [manuscrito] / Juliana Rabelo de Sousa
94 f. ; enc.

Orientadora: Luciana Rocha Barros Gonçalves
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará,
Fortaleza, 2008

1. Resíduo agroindustrial 2. Ramnolipídeo 3. *Pseudomonas
aeruginosa* I. Gonçalves, Luciana Rocha Barros (orient.) II.
Universidade Federal do Ceará – Pós-Graduação em Engenharia
Química III. Título

CDD 660

A Deus, e à minha família, pais e irmão, que sempre estiveram ao meu lado, pela fé, apoio e amor incondicionais que foram imprescindíveis para minha vida.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi o resultado da atuação de diversas pessoas na minha vida profissional e pessoal, a quem apresento meus sinceros agradecimentos.

A Professora Luciana Rocha Barros Gonçalves, por sua orientação, apoio, incentivo e compreensão, que não se limitaram ao desenvolvimento deste trabalho, mas também ao longo desta etapa da minha vida profissional.

Aos profissionais que tive a imensa oportunidade de conhecer e trabalhar, por seus incentivos e conhecimentos adquiridos, em especial à Dra. Maria de Fátima Borges, ao Pesquisador Gustavo Adolfo Saavedra Pinto, à Prof. Vânia Maria M. Melo e ao Químico Marcelo Parente.

Ao amigo e profissional da química Gustavo por seu apoio e dedicação sempre constantes, resultando em grande contribuição para este trabalho.

À Professora Otilia Deusdênia L. Pessoa, coordenadora do Laboratório de Análise Citoquímica de Plantas Medicinais – Departamento de Química Orgânica - UFC, pela realização de análises cromatográficas, bem como, por seu apoio, atenção e novos conhecimentos adquiridos.

Ao CENAUREMN, por parte do Prof. Edilberto e Daniel, que permitiram a realização das análises espectroscópicas necessárias para este trabalho.

Ao Laboratório de Solos da Embrapa – CNPAT, em especial ao Nailton, pela realização de análises químicas.

Aos integrantes do GPBio – Grupo de Pesquisa em Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos, pela companhia e conhecimentos compartilhados.

Aos docentes e funcionários do DEQ-UFC.

Ao CNPq pela bolsa de pesquisa fomentada.

À minha família e Alexandre pela dedicação, amor, carinho, compreensão e incentivos durante minha vida.

E, finalmente, aos amigos do coração Ana, Ada, Estela, Izabelly, Jéssyca, Carlos, Gi, Euclides, Phillipi e Paulinha, que contribuíram com sua amizade, carinho e confiança em vários momentos da minha vida.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a glicerina resultante da transesterificação do óleo de mamona como fonte de carbono e nutrientes para *P. aeruginosa* LAMI. O efeito da concentração de nutrientes e de condições ambientais foi avaliado de acordo com dois planejamentos fatoriais completos sobre o crescimento celular, produção de biossurfactante e propriedades tensoativas do surfactante produzido. A análise estatística dos dados foi realizada pelo *software* Statistica 6.0. Avaliou-se o efeito da concentração de glicerina e de nitrato de sódio e do tamanho do inóculo, de acordo com um planejamento fatorial 2^3 . Uma análise dos efeitos mostrou que o aumento da concentração de nitrato e a redução da concentração de glicerina favoreceram a produção de biossurfactantes atingindo-se uma concentração máxima de 1,6 g/L de ramnose. A partir deste resultado, realizou-se um planejamento fatorial completo 2^4 avaliando-se os fatores concentração de nitrato e de fosfato, pH e temperatura. Os resultados mostraram que a redução da razão carbono/nitrogênio (C/N), com um ótimo equivalente a 12, favoreceu a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* LAMI, bem como a redução da concentração de fosfato em pH 7,0 e temperatura de 37 °C. Nestas condições obteve-se 2,3 g/L de ramnose, atingindo-se coeficientes de rendimento em termos de substrato ($Y_{P/S}$) e de biomassa ($Y_{P/X}$) de 0,103 g/g e 3,13 g/g, respectivamente. A produtividade volumétrica máxima foi 31,94 mg/Lh. A cinética de crescimento celular e produção de biossurfactantes foi avaliada, variando-se a razão C/N de 21 a 86. Os perfis de produção de biomassa e de ramnolipídeos sugeriram uma cinética mista, semi-associada ao crescimento. O biossurfactante obtido de acordo com a melhor condição de cultivo foi capaz de formar emulsões com querosene, óleo de soja, éster metílico e óleo naftênico, com índice de emulsificação de, aproximadamente, 60 %. Uma atividade emulsificante equivalente a 3,25 unidades mostrou que o biossurfactante foi capaz de formar emulsões óleo-água. O biossurfactante foi extraído do meio de cultivo livre de células e submetido a purificação por cromatografia. A cromatografia em camada delgada mostrou a presença de dois produtos majoritários. O espectro de ressonância magnética nuclear H^1 apresentou deslocamentos químicos característicos de grupamentos químicos que constituem uma molécula de diramnolipídeo tipo Rha-Rha-C₁₀C₁₀. Entretanto, a elucidação completa da estrutura do ramnolipídeo deve ser complementada por análises espectroscópicas de maior resolução.

Palavras-chave: glicerina, ramnolipídeo, *P. aeruginosa*.

ABSTRACT

The aim of this work was analysing the glycerine from castor oil transesterification as a source of carbon and nutrients to *P. aeruginosa* LAMI. Nutrients concentration and environmental conditions were studied using two complete factorial planning, with cellular growth, biosurfactant production and product surface active properties as response variables. The statistic analysis was done using the software Statistica 6.0. First of all, inoculum size and concentrations of glycerine and NaNO_3 were analysed with a 2^3 factorial planning. The increase in nitrate concentration and a decrease in glycerine concentration favored biosurfactants production, reaching a maximum rhamnolipid concentration of 1.6 g/L. A complete 2^4 factorial planning was planned based on these results. Nitrate and phosphate concentrations, pH and temperature were selected factors. Results showed that a decrease in carbon/nitrogen ratio, with an optimum of 12, and phosphate concentration favored rhamnolipid production by *P. aeruginosa* LAMI at pH 7.0 and 37 °C. A rhamnolipid concentration of 2.3 g/l was obtained, with product yields on substrate and biomass of 0.103 and 3.13 g/g, respectively. The volumetric productivity was 31.94 mg/L.h. The influence of carbon/nitrogen ratio, from 21 to 86, on growth kinetics and biosurfactant production was studied. Biomass and rhamnolipids production behavior suggest a mixed kinetics, semi-associated to growth. The biosurfactant produced using the optimized conditions formed emulsions with kerosene, soybean oil, methyl esters (biodiesel) and naphthenic oil, with emulsification index of about 60%. An emulsification activity of 3.25 units was also obtained, showing that the biosurfactant may be used to form oil-water emulsions. Finally, the biosurfactant was extracted from a free-cell fermented medium and submitted to chromatographic purification. The analytical thin layer chromatography showed the presence of two mainly products. The ^1H nuclear magnetic spectra showed characteristic signals of chemical groups that are typical of a dirhamnolipid Rha-Rha- $\text{C}_{10}\text{C}_{10}$ molecule. However, a complete explanation of the rhamnolipid structure must be completed by high resolution spectroscopy analysis.

Keywords: glycerin, rhamnolipid, *P. aeruginosa*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Tipos de estruturas de ramnolipídeos produzidos por <i>Pseudomonas spec.</i> DSM 2874 sob diferentes condições de cultivo com glicerol ou n-alcenos como fontes de carbono (Syldatk <i>et al.</i> , 1985).....	21
FIGURA 2	Estruturas das moléculas de ramnolipídeo A e B produzidos por <i>Pseudomonas</i> BOP100 em cultivo com etanol como fonte de carbono ..	22
FIGURA 3	Diferentes cinéticas de fermentação para produção de biossurfactantes. (A) produção associada ao crescimento, (B) produção sob condições limitantes de crescimento, (C) produção por <i>resting cells</i> ou células imobilizadas.....	23
FIGURA 4	Fluxograma do processo de obtenção de biodiesel por transesterificação.....	31
FIGURA 5	Diagrama de Pareto para a produção de bissurfactantes por <i>P. aeruginosa</i> LAMI a 150rpm e temperatura de 30°C durante 96 horas.....	45
FIGURA 6	Superfície de resposta gerada através do ajuste de um modelo polinomial para a variável-resposta produção de biossurfactante a partir do cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LAMI a 150rpm e 30°C.....	45
FIGURA 7	Diagrama de Pareto para a variável-resposta tensão superficial obtido através do cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LAMI a 150rpm e 30°C durante 96 horas de acordo com um planejamento fatorial $2^3 + 3$	46
FIGURA 8	Índice de emulsificação com querosene realizado com meio de cultura livre de células obtido a partir do cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LAMI a 150rpm e 30°C durante 96 horas.....	47
FIGURA 9	Resultados de produção de biomassa e de biossurfactante e consumo de glicerol para os ensaios realizados com <i>P. aeruginosa</i> LAMI de acordo com planejamento fatorial $2^4 + 3$	50
FIGURA 10	Efeitos principais e de interação obtidos a partir da relação entre os fatores concentração de nitrato, concentração de fosfato, pH e temperatura através de um Planejamento Fatorial Completo 2^4 para a produção de biomassa	

	por <i>P. aeruginosa</i> LAMI.....	52
FIGURA 11	Médias marginais obtidas para os fatores concentração de fosfato e pH para a variável-resposta produção de biomassa a partir de um planejamento fatorial $2^4 + 3$	53
FIGURA 12	Diagrama de Pareto para a variável-resposta tensão superficial obtido através do cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LAMI a 150rpm durante 96 horas de acordo com um planejamento fatorial $2^4 + 3$	54
FIGURA 13	Diagrama de Pareto para a variável-resposta produção de biossurfactante obtido através do cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LAMI a 150rpm durante 96 horas de acordo com um planejamento fatorial $2^4 + 3$	55
FIGURA 14	Médias marginais obtidas para os fatores concentração de fosfato e pH para a variável-resposta produção de biossurfactante a partir de um planejamento fatorial $2^4 + 3$	56
FIGURA 15	Distribuição de valores residuais versus valores preditos pelo modelo proposto referente aos efeitos dos fatores concentração de nitrato e de fosfato, pH e temperatura para a produção de biossurfactantes por <i>P. aeruginosa</i> LAMI de acordo com um planejamento fatorial $2^4 + 3$	60
FIGURA 16	Valores preditos e observados obtidos a partir de um modelo polinomial proposto para a variável resposta tensão superficial de acordo com planejamento fatorial completo $2^4 + 3$	62
FIGURA 17	Superfície de resposta obtida a partir da equação 3 para a variável-resposta tensão superficial com fatores fixos de $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 8,43 \text{ g/L}$ e $\text{NaNO}_3 = 4,0 \text{ g/L}$	63
FIGURA 18	Cinéticas de crescimento celular, produção de biossurfactante e consumo de glicerol para <i>P. aeruginosa</i> LAMI de acordo com o ensaio 14 ($[\text{NaNO}_3] = 4,0 \text{ g/L}$, $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 8,43 \text{ g/L}$, pH 7,0 e T = 37 °C).....	65
FIGURA 19	Cinética de crescimento celular e produção de biossurfactante para <i>P. aeruginosa</i> LAMI com glicerol PA sob as condições de cultivo do ensaio 14 ($[\text{NaNO}_3] = 4,0 \text{ g/L}$, $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 8,43 \text{ g/L}$, pH 7,0, T = 37 °C e $[\text{glicerol}] = 23,9 \text{ g/L}$).....	66

FIGURA 20	Cinéticas de crescimento celular para <i>P. aeruginosa</i> LAMI com glicerol PA e glicerina sob as condições de cultivo do ensaio 14 ($[\text{NaNO}_3] = 4,0$ g/L, $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 8,43$ g/L, pH 7,0, T = 37°C e $[\text{glicerol}] = 23,9$ g/L).....	67
FIGURA 21	Comportamento do crescimento celular com relação à razão C/N em cultivo submerso de <i>P. aeruginosa</i> LAMI a 150 rpm e 37 °C.....	68
FIGURA 22	Comportamento do pH de um cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LAMI durante 72 horas a 150 rpm e 37 °C em meio de cultivo contendo glicerol como fonte de carbono e NaNO_3 como fonte de nitrogênio e sob diferentes razões C/N.....	70
FIGURA 23	Comportamento do pH de um cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LAMI durante 96 horas sob agitação de 150 rpm e 37 °C em meio de cultivo contendo glicerol como fonte de carbono e NaNO_3 como fonte de nitrogênio para uma razão C/N = 12.....	70
FIGURA 24	Perfil do consumo de glicerol a partir do cultivo submerso de <i>P. aeruginosa</i> LAMI a 150 rpm e 37 °C com glicerol como fonte de carbono e NaNO_3 como fonte de nitrogênio para diferentes razões C/N.....	72
FIGURA 25	Cinética de crescimento celular e produção de biomassa a partir de um cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LAMI a 150 rpm e 37 °C para uma razão C/N = 86.....	73
FIGURA 26	Cinética de crescimento celular e produção de biomassa a partir de um cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LAMI a 150 rpm e 37 °C para uma razão C/N = 59.....	73
FIGURA 27	Cinética de crescimento celular e produção de biomassa a partir de um cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LAMI a 150 rpm e 37 °C para uma razão C/N = 36.....	74
FIGURA 28	Cinética de crescimento celular e produção de biomassa a partir de um cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LAMI a 150 rpm e 37 °C para uma razão C/N = 21.....	74
FIGURA 29	Cinética de crescimento celular e produção de biomassa a partir de um cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LAMI a 150 rpm e 37 °C para uma razão C/N =	

	12.....	75
FIGURA 30	Valores de índice de emulsificação e atividade emulsificante com querosene comercial com meio de cultivo livre de células de <i>P. aeruginosa</i> LAMI para os ensaios realizados de acordo com planejamento fatorial $2^4 + 3$	76
FIGURA 31	Índice de emulsificação com diferentes substratos hidrofóbicos realizados em meio de cultura livre de células obtido de acordo com o ensaio 14 ($[\text{NaNO}_3] = 4,0 \text{ g/L}$, $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 8,43 \text{ g/L}$, pH 7,0 e T = 37 °C).....	77
FIGURA 32	Cromatografia em camada delgada dos ramnolipídeos produzidos por <i>P. aeruginosa</i> LAMI com glicerol como substrato e cultivo de 72 horas a 37 °C sob agitação de 150 rpm. A – Produto 1, B – Mistura 1 + 2, C – Produto 2.....	78
FIGURA 33	Estruturas de mono ($\text{RhaC}_{10}\text{C}_{10}$) e diramnolipídeos ($\text{Rha-RhaC}_{10}\text{C}_{10}$).....	79

LISTA DE TABELAS

1.	Aplicações potenciais de biossurfactantes.....	18
2.	Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores.....	19
3.	Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^3 utilizado no estudo da influência da concentração de glicerol, nitrato e tamanho de inóculo na produção de biossurfactante por <i>P. aeruginosa</i> LAMI cultivada a 30 °C, 150 rpm e pH 5,4.....	36
4.	Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^4 utilizado no estudo da influência de condições de cultivo e nutricionais sobre a produção de biomassa, produção de biossurfactante tensão superficial por <i>P. aeruginosa</i> LAMI cultivada sob agitação de 150 rpm.....	36
5.	Caracterização de macro e microelementos da glicerina bruta e tratada resultante da transesterificação do óleo de mamona.....	41
6.	Viscosidades cinemáticas a 40 °C das glicerinas bruta e tratada de acordo com norma ASTM 445 para produtos de petróleo.....	42
7.	Matriz de resultados obtidos a partir de um planejamento fatorial 2^3 do cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LAMI a 150rpm e temperatura de 30°C durante 96 horas e meio de cultivo cuja composição foi (g/L): KH_2PO_4 3,0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 e pH 5,4.....	47
8.	Matriz de resultados da produção de biossurfactante, crescimento celular, tensão superficial, pH e consumo de glicerol obtidos após 96 horas de cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LAMI a 150 rpm de acordo com um Planejamento Fatorial Completo 2^4 .	48
9.	Coefficientes de rendimento para os ensaios obtidos a partir do Planejamento Fatorial 2^4 após 96 horas de cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LAMI a 150rpm com glicerol como fonte de carbono.....	51
10.	Coefficientes de rendimento ($Y_{P/X}$) e Produtividades volumétricas (Q_P) para a produção de biossurfactantes por espécies de <i>Pseudomonas</i>	51
11.	Coefficientes de regressão para o modelo de polinomial proposto para o crescimento celular de <i>P. aeruginosa</i> LAMI de acordo com um planejamento fatorial 2^4 com	

	triplicata no ponto central.....	57
12.	Coeficientes de Regressão para o modelo polinomial proposto para a produção de biossurfactantes por <i>P. aeruginosa</i> LAMI de acordo com um planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central.....	58
13.	Análise da variância para um ajuste polinomial para a variável produção de biossurfactante com <i>P. aeruginosa</i> LAMI de acordo com um planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central.....	59
14.	Coeficientes de regressão para o modelo polinomial para a tensão superficial obtido a partir do cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LAMI de acordo com um planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central.....	60
15.	Análise da variância para a variável-resposta tensão superficial obtido a partir do cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LAMI de acordo com um planejamento fatorial completo 2^4 com triplicata no ponto central.....	61
16.	Produção de biomassa, de ramnolipídeo e pH final obtidos a partir do cultivo de <i>P. aeruginosa</i> LAMI durante 96 horas sob agitação de 150 rpm a 30 °C em meio contendo 2,4 g/L da fonte de nitrogênio, 3,0 g/L de KH_2PO_4 , 7,0 g/L de K_2HPO_4 , 0,2g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 % (v/v) de glicerina e pH 7,0.....	64
17.	Coeficientes de rendimento obtidos para <i>P. aeruginosa</i> LAMI obtidos a partir da cinética de crescimento celular e produção de biossurfactantes de acordo com o ensaio 14 ($[\text{NaNO}_3] = 4,0\text{g/L}$, $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 8,43\text{ g/L}$, pH 7,0 e $T = 37^\circ\text{C}$).....	65
18.	Produções de biomassa a partir do cultivo a 150 rpm e 37 °C de <i>P. aeruginosa</i> LAMI em meio formulado com glicerina como fonte de carbono e NaNO_3 como fonte de nitrogênio utilizando razões C/N de 86, 59, 36 e 21.....	68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	Surfactantes.....	18
2.2	Surfactantes produzidos por bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i>	19
2.3	Cinética da produção de biossurfactantes.....	23
2.4	Influência das condições nutricionais e ambientais sobre a produção de ramnolipídeos.....	25
2.5	Processos de recuperação e purificação de biossurfactantes.....	28
2.6	Co-produtos do biodiesel.....	29
2.7	Obtenção de bioprodutos a partir do resíduo glicerinoso da indústria do biodiesel.....	31
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1	Caracterização da matéria-prima.....	34
3.2	Pré-tratamento da matéria-prima.....	34
3.3	Microrganismo.....	35
3.4	Ensaio fermentativo.....	35
3.5	Delineamento experimental.....	35
3.6	Efeito de diferentes fontes de nitrogênio.....	37
3.7	Estudo da cinética de produção de biossurfactante e crescimento celular.....	37
3.8	Determinação do Crescimento Celular.....	37
3.9	Métodos Analíticos.....	38
3.9.1	Determinação de Ramnose.....	38
3.9.2	Determinação de Glicerol.....	38
3.10	Caracterização do Biossurfactante.....	38
3.10.1	Índice de Emulsificação.....	38
3.10.2	Tensão Superficial.....	39
3.10.3	Atividade Emulsificante e Estabilidade de emulsão óleo-água.....	39
3.11	Extração e purificação do biossurfactante.....	39
3.11.1	Extração líquido-líquido.....	39
3.11.2	Cromatografia em coluna e em camada delgada.....	40
3.12	Cálculo da Razão C/N.....	40

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1	Caracterização da matéria-prima.....	41
4.2	Estudo das condições de cultivo através de delineamento experimental fatorial.....	42
4.2.1	Influência da concentração de glicerol e de NaNO ₃ sobre a produção de biossurfactantes.....	42
4.2.2	Avaliação da influência da concentração de fosfato e de NaNO ₃ , do pH e da temperatura sobre a produção de biossurfactante.....	47
4.3	Efeito de diferentes fontes de nitrogênio sobre o crescimento celular e a produção do biossurfactante.....	63
4.4	Estudo da Cinética de Crescimento Celular, Produção de Biossurfactante e Consumo de Glicerol por <i>P. aeruginosa</i> LAMI.....	64
4.5	Avaliação do biossurfactante produzido quanto a capacidade de emulsificar hidrocarbonetos.....	75
4.6	Purificação dos Biossurfactantes obtidos por Cromatografia em Coluna e Cromatografia em Camada Delgada.....	78
5	CONCLUSÕES.....	81
6	TRABALHOS FUTUROS.....	83
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
	ANEXO A.....	91
	ANEXO B.....	92
	ANEXO C.....	93
	ANEXO D.....	94

1 – INTRODUÇÃO

O crescente interesse mundial no uso de combustíveis a partir de fontes renováveis tem aumentado a demanda por biocombustíveis. Como exemplos, pode-se citar o etanol e o biodiesel, obtidos a partir de matérias-primas renováveis, como a cana-de-açúcar, lignocelulósicos, oleaginosas e gordura animal, dentre outras, e cuja utilização permite reduzir as emissões de monóxido de carbono, comparados a combustíveis derivados do petróleo (Ashby *et al.*, 2005).

As rotas de obtenção do biodiesel são craqueamento, esterificação e transesterificação, sendo esta última a rota predominantemente utilizada no nordeste brasileiro (SEBRAE, 2007). O processo consiste na reação entre um óleo vegetal e um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol) na presença de um catalisador. Os principais resíduos gerados são tortas e farelos, oriundos da extração do óleo vegetal, e a glicerina, resultante da reação de transesterificação.

A inserção do biodiesel na matriz energética nacional iniciou em 2005 com a implantação do B2 (*blends* de 2% de biodiesel em diesel), gerando volumes de glicerina da ordem de 60 a 80 mil toneladas por ano e com a introdução do B5 (*blends* de 5% de biodiesel em diesel), em 2013, a previsão é que esta produção aumente para 150 mil toneladas por ano (Mota *et al.*, 2005), dada a sua elevada produção durante a transesterificação. Sabe-se que a cada 1.000 L de biodiesel produzido, cerca de 100 Kg de glicerina é gerada, de acordo com dados da TECBIO-Tecnologias Bioenergéticas, uma Empresa de Tecnologia em Biodiesel. Ressalta-se que a principal aplicação do glicerol ocorre na indústria de cosméticos, saboaria e fármacos, setores que são incapazes de absorver o volume de glicerina gerado com a produção do biodiesel (Gonçalves *et al.*, 2006). Portanto, haverá um excedente de glicerina no mercado, ocasionando a conseqüente desvalorização deste produto.

Entretanto, a glicerina constitui uma fonte de matéria-prima para produtos de alto valor agregado, como polímeros, obtidos através de conversão química ou bioquímica (rotas fermentativas) e aditivos para combustíveis, como ésteres e éteres de glicerina, que também se apresentam como alternativa rentável para este co-produto (Karinen *et al.*, 2006).

Os surfactantes constituem uma importante classe de produtos químicos aplicados em diversos setores da indústria. Tais compostos disponíveis atualmente no mercado são, em sua maioria, derivados do petróleo o que lhes confere um caráter não biodegradável e tóxico ao meio ambiente. Entretanto, o crescente aumento na produção mundial destes derivados e a necessidade da obtenção de produtos compatíveis com o ambiente têm dado ênfase à produção de surfactantes biológicos como alternativa aos produtos existentes (Banat *et al.*, 2000).

Os biossurfactantes constituem uma classe de surfactantes que são produzidos a partir de organismos vivos, podendo ser encontrados em superfícies de células microbianas ou excretados extracelularmente. Apesar de apresentar diversas vantagens sobre os surfactantes químicos, os surfactantes microbianos ainda não são amplamente utilizados devido aos altos custos de produção, associados a métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros. O problema econômico da produção de biossurfactantes pode ser significativamente reduzido através do uso de fontes alternativas de nutrientes, facilmente disponíveis e de baixo custo e que permitam altas concentrações de biossurfactante (Kosaric, 1992, Rocha *et al.*, 2006).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* produzem biossurfactantes que são normalmente denominados ramnolipídeos, um glicolipídeo formado por uma ou duas moléculas de ramnose e por uma cadeia de ácido graxo. São os biossurfactantes mais estudados e apresentam aplicação em diversos setores industriais e em biorremediação (Desai e Banat, 1997).

Este trabalho teve, portanto, o objetivo de avaliar a glicerina proveniente da produção de biodiesel por transesterificação do óleo de mamona como fonte de carbono e nutrientes para o crescimento e produção de surfactantes por *P. aeruginosa* LAMI.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Surfactantes

Surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. As principais características desses compostos são a capacidade de formar agregados micelares a partir de uma determinada concentração, denominada concentração micelar crítica (CMC), e reduzir a tensão superficial e interfacial de líquidos. Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos que são aplicados em diversos setores da indústria moderna (Banat *et al.*, 2000). Indústrias americanas registraram um aumento de 300 % na demanda por surfactantes nas últimas décadas (Greek, 1990).

Surfactantes naturais são sintetizados por uma variedade de organismos vivos, tais como plantas (saponinas), animais (ácidos biliares) e microrganismos (glicolípídeos) (Bognolo, 1999). Os biossurfactantes são produzidos por bactérias, leveduras e fungos e constituem um grupo diversificado de surfactantes que possuem aplicações variadas em setores industriais devido a sua versatilidade funcional (Ishigami e Suzuki, 1997). Apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, tais como: baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, elevada compatibilidade ambiental, biodigestibilidade e efetividade em condições extremas de temperatura, pH e força iônica (Cameotra e Makkar, 1998 e Kosaric, 1992). Estas características permitem a sua utilização na agricultura, cosméticos, produção de petróleo, lubrificantes, entre outros. Como propriedades funcionais pode-se destacar a atividade emulsificante, molhabilidade, solubilização, de-emulsificação, inibição a corrosão, complexação de metais e redução da viscosidade de óleos pesados (Fiechter, 1992). A Tabela 1 apresenta essas funções associadas a aplicações em alguns setores industriais.

Tabela 1 – Aplicações potenciais de biossurfactantes.

Função	Aplicação
Dispersantes e emulsificantes	Cosméticos, tintas, aditivos para óleo
Solubilizantes e microemulsões	Produtos farmacêuticos
Agentes umectantes	Indústria têxtil, tintas e fármacos
Detergentes	Produtos agrícolas e domésticos

Agentes espumantes	Cosméticos e produtos para flotação
Agentes sequestrantes de metais	Mineração
Deemulsificantes	Tratamento de resíduos líquidos
Agentes redutores de viscosidade	Transporte de óleo cru através de tubulações
Recuperação Melhorada do Petróleo	Recuperação melhorada do petróleo

Fonte: Banat *et al.*, 2000.

Os surfactantes microbianos apresentam, ainda, baixos valores de CMC comparativamente aos surfactantes sintéticos, capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 25-30 mN/m e tensões interfaciais menores que 1 mN/m (Lang, 2002). A Tabela 2 apresenta as principais classes de biossurfactantes, bem como, alguns microrganismos produtores.

Tabela 2 – Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores

Classe	Microrganismos	Biossurfactantes
Glicolípídeos	<i>Pseudomonas</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Mycobacterium</i>	Ramnilípídeos, soforolípídeos, celobiose lipídeos
Lipoproteínas e Lipopeptídeos	<i>Bacillus</i>	Surfactina
Ácidos graxos, Fosfolípídeos e Lípídeos Neutros	<i>Rhodococcu. erythropolis</i>	Fosfatidiletanolamina
Biossurfactantes Poliméricos	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Candida</i> <i>lipolytica</i>	Emulsan, liposan

Fonte: Gautam e Tyagi, 2006.

2.2 – Surfactantes produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas*

Um dos primeiros trabalhos publicados na literatura científica sobre a síntese microbiana de um glicolípídeo foi relatado por Jarvis e Johnson em 1949, a partir do cultivo de uma linhagem de *P. aeruginosa* em glicerol 3 % e peptona 4 % a 30 °C sob agitação, obtendo-se uma concentração de 2,5 g/L. Este trabalho forneceu uma importante contribuição acerca da

identificação de propriedades físicas e químicas do novo composto obtido. O produto foi obtido sob a forma cristalina a partir da acidificação do meio livre de células a pH 2 com ácido sulfúrico. Os cristais foram separados por filtração e submetidos a testes de solubilidade em solventes diversos. Desta forma, verificou-se que o novo composto era solúvel em éter, etanol, acetona, dioxano e soluções diluídas de bicarbonato de sódio. A estrutura química continha unidades de ramnose e de ácido β -hidroxidecanóico. Por fim, os autores propuseram uma estrutura em que duas unidades do ácido β -hidroxidecanóico existiam sob a forma esterificada, entretanto, a ligação entre as unidades do açúcar não foi completamente elucidada. Edwards e Hayashi (1965) verificaram, através de oxidação por periodato da molécula de ramnolípido, que as ligações de ramnose eram do tipo 1,2 glicosídicas. Desta forma, as primeiras estruturas de ramnolípido reportadas na literatura foram do tipo RhaC₁₀C₁₀ e RhaRhaC₁₀C₁₀.

Syldatk *et al.* (1985) obtiveram quatro tipos de ramnolípidos ao cultivarem *Pseudomonas* sp DSM 2874 em n-alkanos, reportando duas estruturas novas, apresentadas como equivalentes hidrofílicos das moléculas de ramnolípido 2 (R2) e ramnolípido 4 (R4). Os estudos de ressonância magnética nuclear (RMN) mostraram a presença de mono e diramnolípidos cujas estruturas estão apresentadas na Figura 1. Os dois principais tipos foram isolados em condições de limitação de nitrogênio, R1 e R3, e os outros dois, ramnolípido 2 (R2) e ramnolípido 4 (R4), foram obtidos através da produção por *resting cells* (células na fase estacionária de crescimento). Os diferentes ramnolípidos foram avaliados quanto as suas propriedades surfactantes e verificou-se que R2 e R4 apresentaram valores de concentração micelar crítica (CMC) de 200 mg/L, enquanto que os compostos mais hidrofóbicos tiveram uma CMC de 10 a 20 mg/L. Os surfactantes purificados atingiram tensões superficiais mínimas de 25 até 31 mN/m. Este resultado indicou que a combinação de uma ou duas unidades de ramnose com apenas uma unidade de ácido β -hidroxidecanóico conduz a valores maiores de CMC.

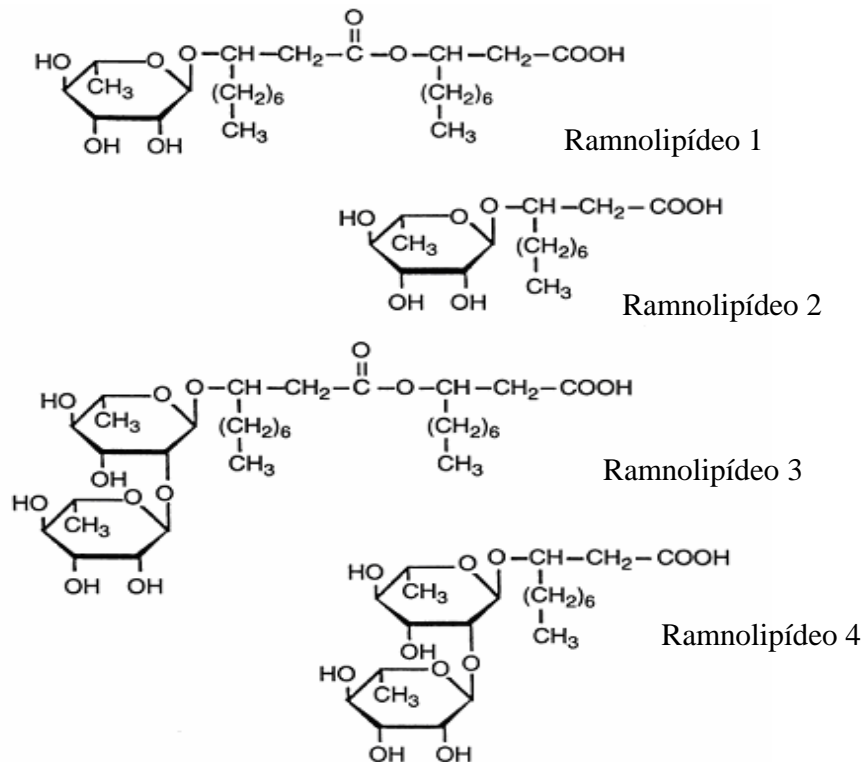


Figura 1 – Tipos de estruturas de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas* sp DSM 2874 sob diferentes condições de cultivo com glicerol ou n-alcanos como fontes de carbono (Syldatk *et al*, 1985).

Em um processo de co-produção de biossurfactante e piocianina cultivando *Pseudomonas* BOP 100 em meio de cultivo contendo etanol como fonte de carbono, Osman *et al*. (1996) identificaram novas estruturas de ramnolipídeos correspondentes aos ramnolipídeos A e B. A Figura 2 apresenta as duas novas estruturas. Neste trabalho, avaliaram-se diferentes concentrações de etanol sobre o crescimento e a co-produção de biomoléculas pela linhagem *Pseudomonas* BOP 100 em cultivo em frascos agitados utilizando NaNO_3 como fonte de nitrogênio. Os ramnolipídeos foram caracterizados em cromatografia líquida de alta performance com amostras padrões de ramnolipídeos A e B. A concentração de etanol em que houve máxima produção de piocianina e biossurfactante foi a 3 %, sendo estes produzidos na fase exponencial e fase estacionária de crescimento, respectivamente.

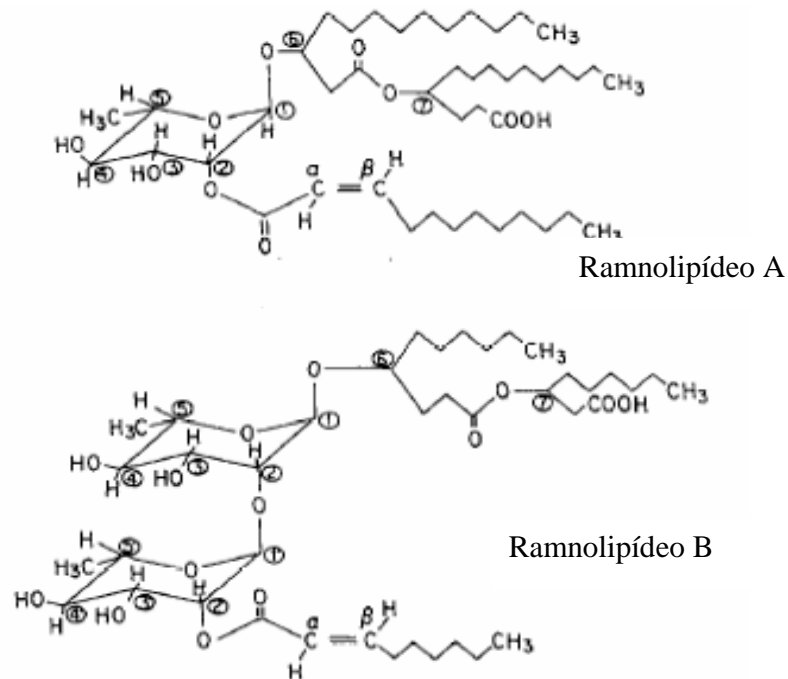


Figura 2 – Estruturas das moléculas de ramnolipídeo A e B produzidos por *Pseudomonas* BOP100 em cultivo com etanol como fonte de carbono (Osman *et al.*, 1996).

A diversidade estrutural de ramnolipídeos sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* quanto ao comprimento e presença de insaturações na cadeia carbônica está bem descrita na literatura. Benincasa (2001) obteve seis estruturas moleculares distintas entre mono e diramnolipídeos ao avaliar a capacidade da linhagem *P. aeruginosa* LB1 em converter resíduos da indústria de óleos vegetais em biossurfactantes. As estruturas foram RhaRhaC₁₀C₁₀, RhaC₁₀C₁₀, RhaRhaC₁₀C₁₂, RhaRhaC₁₀C_{12:1}, RhaC₁₀C_{12:1} e RhaC₁₀C₁₂. As frações molares foram, respectivamente, 28,9, 23,4, 11,3, 23,0, 7,9 e 5,5%.

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são reconhecidas por sua capacidade de produzir biossurfactantes. Dentre estas, destacam-se a *P. fluorescens*, a *P. aeruginosa* e a *P. rubescan* (Bhattacharyya *et al.*, 2003). Bhattacharyya *et al.* (2003) avaliaram duas cepas selvagens de *Pseudomonas* quanto à produção de surfactantes. O cultivo destas linhagens em meio líquido sob agitação durante 15 dias a 37°C forneceu a produção de surfactantes do tipo lipídeo neutro, fosfolipídeos e ramnolipídeos. Hernandez-Anguiano *et al.* (2004) identificaram que uma linhagem de *P. fluorescens* possuía atividade surfactante, bem como, verificaram que o potencial

invasivo de patógenos bacterianos é melhorado pela produção de biossurfactantes. A produção de ramnolipídeos por *P. chlororaphis* foi avaliada (Gunther IV *et al.*, 2005) e obteve-se que, quando cultivada a temperatura ambiente em meio de sais minerais contendo 2 % de glicose sob condições estáticas, esta linhagem produz até 1 g/L do surfactante. Sua composição foi exclusivamente de monoramnolipídeos, sendo que as espécies moleculares predominantes foram um ácido hidroxigraxo monoinsaturado de 12 carbonos e um ácido hidroxigraxo saturado de 10 carbonos.

2.3 – Cinética da Produção de Biossurfactantes

A cinética de produção de biossurfactantes exhibe muitas variações entre os vários sistemas possíveis de serem empregados, sendo poucas as generalizações que podem ser realizadas (Desai e Banat, 1997). Entretanto, alguns tipos de cinéticas permitem a seguinte classificação: (a) produção associada ao crescimento; (b) produção sob condições limitantes de crescimento; (c) produção por células imobilizadas ou *resting*; (d) produção com suplementação de precursores. A Figura 3 apresenta diferentes tipos de cinética de fermentação.

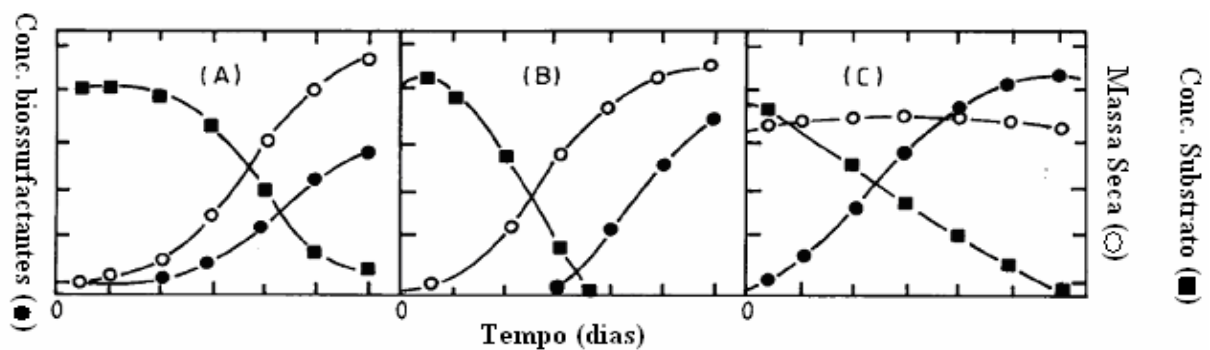


Figura 3 – Diferentes cinéticas de fermentação para produção de biossurfactantes. (A) produção associada ao crescimento, (B) produção sob condições limitantes de crescimento, (C) produção por *resting cells* ou células imobilizadas. Fonte: Desai e Banat, 1997.

(a) Produção associada ao crescimento

A produção associada ao crescimento é caracterizada pela obtenção de perfis paralelos de crescimento e produção de biossurfactante e consumo de substrato. Na Figura 3A este perfil é apresentado. Rodrigues *et al* (2006), ao realizarem otimização do meio de cultivo empregando

metodologia de superfície de resposta, verificaram que a produção de biossurfactantes por *Lactococcus lactis* 53 e *Streptococcus thermophilus* A foi associada ao crescimento, permitindo que o crescimento celular fosse utilizado como variável-resposta. Emulsan, um bioemulsificante produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, foi identificado associado a células do início da fase exponencial de crescimento (Goldman *et al*, 1982).

(b) Produção sob condição limitante de crescimento

A produção sob condição limitante de crescimento caracteriza-se por um rápido aumento da taxa de formação do produto no início da fase estacionária de crescimento ocasionada pela exaustão de algum nutriente, exceto carbono. Este comportamento pode ser visualizado na Figura 3B. Bactérias do gênero *Pseudomonas* apresentam, em geral, este tipo de cinética sendo a limitação ocasionada por nitrogênio ou fósforo. Boulton e Ratledge (1987) atribuíram este fato ao estímulo do acúmulo de lipídeos através da limitação de nutrientes via nitrogênio, que consiste a etapa limitante da biossíntese de ramnolipídeos.

(c) Produção por células imobilizadas ou *resting cells*

O emprego de um sistema com *resting cells* ou células imobilizadas para a produção de biossurfactantes é caracterizado pela ausência de multiplicação celular. Entretanto, as células continuam a utilizar a fonte de carbono para a síntese de biossurfactantes, como demonstrado na Figura 3C (Desai e Banat, 1997). Ramana e Karanth (1989) ao avaliarem a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* CFTR-6 verificaram aumento da produtividade ao utilizar um sistema de *resting cells* em meio deficiente em fosfato. Chayabutra *et al* (2001) empregaram *resting cells* para a produção de ramnolipídeos utilizando fósforo como nutriente limitante.

(d) Produção com suplementação de precursores

A adição de precursores ao meio de cultivo promove o aumento da produção de biossurfactantes, bem como interfere na biossíntese da molécula pelo microrganismo (Syldatk e Wagner, 1987). Este método torna-se promissor devido a influência da fonte de carbono sobre as propriedades físicas e químicas dos surfactantes produzidos.

2.4 – Influência das condições nutricionais e ambientais sobre a produção de ramnolipídeos

Dados apresentados na literatura mostram que a produção de ramnolipídeos por bactérias do gênero *Pseudomonas* é bastante influenciada pela fonte de carbono, fonte de nitrogênio, concentração de fósforo e cátions multivalentes. A razão C/N representa um fator extremamente importante na etapa de otimização do meio de cultivo, bem como a razão C/P. O uso de fontes de carbono é bastante diversificada sendo possível utilizar fontes simples, como glicose e glicerol, e substratos mais complexos, como lipídeos, alcanos, ésteres de ácidos graxos, mostrando que linhagens de *Pseudomonas* apresentam imensa versatilidade metabólica. Arino *et al* (1996) verificaram que uma linhagem de *Pseudomonas* isolada a partir de um solo contaminado com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) foi capaz de crescer e produzir glicolipídeos em n-alcanos (C₁₀-C₁₇), ésteres de ácido graxos (C₁₀-C₁₈) e glicerol.

A otimização das condições de cultivo consiste em uma etapa determinante para a viabilidade econômica do biossurfactante, pois o aumento dos níveis de produção permite que este seja competitivo com relação aos surfactantes químicos. Neste contexto, Guerra-Santos *et al* (1984) utilizaram um processo contínuo para a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* com glicose como fonte de carbono. Os autores verificaram que o nitrato foi a fonte de nitrogênio mais eficiente com relação ao sulfato de amônio e que o extrato de levedura não favoreceu a produção de biossurfactante, mas sim o crescimento celular, sendo o substrato (glicose) totalmente consumido. O uso das fontes inorgânicas de nitrogênio conduziu a uma condição limitante de crescimento, através da escassez deste nutriente e não da fonte de carbono, sendo que, a maior produção de ramnolipídeos ocorreu com uma razão C/N equivalente a 18. Assim, verificou-se que a limitação do crescimento favoreceu a produção do biossurfactante. A influência do ferro foi avaliada sobre o crescimento e a produção de biossurfactante, em que a diminuição da concentração deste micronutriente favoreceu sua produção, reduzindo a concentração de biomassa e demonstrando que o metabolismo celular é sensível a concentração de ferro. A suplementação de fósforo ao meio de cultivo apresentou melhor resultado com uma razão C/P de 16, entretanto, este nutriente não foi limitante. Desta forma, este trabalho mostrou a necessidade em se estabelecer um estado metabólico, que foi atingido através da limitação de algum nutriente, exceto carbono, durante a condução do processo.

Syldatk *et al.* (1985) avaliaram a produção de biossurfactantes utilizando *Pseudomonas sp* DSM 2874 a partir de n-alcanos e glicerol. A influência do pH, temperatura, diferentes fonte de carbono e nitrogênio e efeito de cátions multivalentes, EDTA e diferentes concentrações de NaCl e tampão fosfato foram avaliadas em um cultivo utilizando *resting cells*. A presença de EDTA, Fe^{2+} e Mg^{2+} causaram uma inibição da produção de biossurfactantes, enquanto que a concentração de Ca^{2+} não exerceu influência. Observou-se, que a produção de ramnolipídeos foi inibida por altas concentrações de nutrientes, sendo este efeito atribuído ao estresse osmótico. Neste caso, com a ausência de uma fonte de nitrogênio atingiu-se um coeficiente de rendimento ($Y_{P/X} = 2,0 \text{ g/g}$) maior do que com a suplementação deste nutriente. Este comportamento foi distinto ao apresentado durante a produção de ramnolipídeos a partir de um inóculo com células na fase exponencial de crescimento, em que o metabolismo de nitrogênio mostrou-se conectado a biossíntese de ramnolipídeos. Fósforo foi necessário para a produção de ramnolipídeos, sendo obtida uma concentração ótima de 65 mM. O efeito da temperatura variou de acordo com a fonte de carbono. No caso do glicerol, uma faixa de 27 a 37 °C apresentou-se ótima, já para n-alcanos houve um ótimo a 37 °C. A temperatura, bem como, a fonte de carbono e o efeito da limitação de nitrogênio interferiram no tipo de molécula de ramnolipídeo sintetizada, bem como na proporção entre as estruturas obtidas.

O efeito do metabolismo de fosfato sobre a produção de ramnolipídeos foi investigado por Mulligan *et al.* (1989). O acompanhamento da atividade das enzimas envolvidas no metabolismo desse nutriente foi relacionada a produção de biossurfactante sendo verificado que o consumo de fosfato e a indução da atividade da enzima fosfatase alcalina coincidiram com o aumento da absorção de glicose no final da fase exponencial de crescimento e com a produção de biossurfactantes a partir de *P. aeruginosa*. Ramana e Karanth (1989) ao empregarem um sistema de *resting cells* para a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* verificaram que fosfato inorgânico atuou como um inibidor.

Osman *et al* (1996) e Matsufuji *et al* (1997) avaliaram etanol como fonte de carbono. Os primeiros autores apresentaram uma técnica de co-produção de biossurfactantes e piocianina, um corante do tipo fenazina, pela linhagem *Pseudomonas* BOP100 em cultivo em frascos agitados. A concentração de etanol que forneceu capacidade máxima de co-produção foi 3 %, obtendo-se 3 g/L de ramnolipídeos e 0,2 g/L de piocianina. A concentrações acima deste valor,

houve inibição Houve aumento do pH após cinco dias de fermentação, sendo este aumento inversamente proporcional a concentração de etanol. Matsufuji *et al* (1997) avaliaram etanol, 1-propanol, 1-butanol, glicose, sacarose, maltose e glicerol sobre o crescimento e produção de biossurfactante por *P. aeruginosa* IFO 3924, encontrando que o etanol foi melhor substrato para a produção de ramnolipídeos e a glicose forneceu o maior crescimento. Neste trabalho, avaliou-se um processo tipo batelada alimentada em que se obteve 32 g/L de ramnolipídeo após 7 dias de cultivo a partir de 55,3 g etanol/L, com uma taxa de conversão do substrato de 58 %. Esta elevada produção foi atribuída ao aumento da razão C/N, que inicialmente na cultura não alimentada era equivalente a três, mas atingiu um valor de 50 durante o cultivo com alimentação.

Mulligan e Gibbs (1989) investigaram a relação entre o metabolismo de nitrogênio e a produção de glicolipídeo por *P. aeruginosa* ATCC 9027. Bactérias do gênero *Pseudomonas* utilizam nitrato, amônia e aminoácidos como fonte de nitrogênio. O nitrato pode ser reduzido a nitrito e então à amônia. A amônia pode ser assimilada por dois sistemas enzimáticos que envolvem as enzimas glutamato desidrogenase e glutamina sintetase. Os autores verificaram a relação da atividade dessas enzimas com a biossíntese de ramnolipídeos. Linhagens que apresentaram elevada atividade de glutamina sintetase forneceram maior produção de ramnolipídeos, dado o efeito regulatório que as enzimas envolvidas no metabolismo de nitrogênio possuem sobre a biossíntese desse glicolipídeo. Entretanto, a capacidade de cepas de *Pseudomonas* realizarem respiração anaeróbia através da assimilação de nitrato por uma rota de desnitrificação tem sido avaliada com relação à produção de biotensoativos. A presença de biossurfactantes quando produzidos em processos aeróbios ocasiona uma grande formação de espuma, acarretando diversos problemas operacionais como vazamentos, com conseqüente redução do volume reacional e perda do produto que permanece na espuma. Chayabutra *et al.* (2001) propuseram um novo sistema de produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* ATCC 10145 em meio de cultivo com fósforo como nutriente limitante e ácido palmítico como fonte de carbono. A fermentação foi inicialmente conduzida sob desnitrificação e posteriormente sob condições aeróbias. Os autores verificaram o efeito da limitação de diferentes nutrientes sobre a produção de biossurfactantes, sendo a limitação por fósforo mais eficiente, fornecendo quatro a cinco vezes maior produtividade do que a limitação por nitrogênio em um cultivo com *resting cells*. A produtividade sob desnitrificação foi cerca de 1/3 da obtida sob condições aeróbias. Manresa *et al.* (1991) estudaram a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas* 44T1 em óleo de

soja como fonte de carbono e nitrato como fonte de nitrogênio, observando que a produtividade específica aumentou com a diminuição da razão C/N, em cultivo em frascos agitados. Os autores apresentaram como possibilidade a absorção de nitrato via denitrificação.

O oxigênio promove diversas respostas fisiológicas sobre bactérias do gênero *Pseudomonas*. Sabra *et al* (2002) verificaram estas respostas durante o cultivo de *P. aeruginosa* PAO1 em condições controladas de aeração. A tensão de oxigênio (pO_2) foi acompanhada através de um eletrodo de oxigênio dissolvido em biorreator de 2,5 L com agitação constante de 500 rpm e temperatura de 37 °C. A taxa de aeração foi constante e equivalente a 1,5 L/min. Foram avaliados diferentes valores de pO_2 , 1, 5, 10 e 50 % da saturação de ar. O crescimento mostrou-se bastante influenciado pelo valor de pO_2 , sendo que a maior produção de biomassa foi obtida com $pO_2 = 1$ %, bem como, houve a menor fase lag. O efeito do estresse oxidativo sobre a produção de ramnolipídeos foi avaliado, entretanto, o perfil de produção de glicolipídeos não foi influenciado pela variação da concentração de O_2 .

2.5 – Processos de Recuperação e Purificação de Biossurfactantes

O processo de recuperação de moléculas bioativas, em muitos processos biotecnológicos, é responsável por até 60% do custo total da produção (Desai e Banat, 1997). Dada a diversidade química dos biotensoativos existe uma gama de processos de separação cuja aplicabilidade depende de características físicas, como carga iônica da molécula e solubilidade e localização (intracelular, extracelular e ligado à parede celular). Como apresentam caráter lipofílico, os biossurfactantes permitem o emprego de métodos clássicos, como extração, precipitação e cristalização para seu isolamento.

Uma das primeiras técnicas utilizadas para recuperação de ramnolipídeos foi a precipitação em meio acidificado sob refrigeração, empregada por Jarvis e Johnson (1949). Obteve-se um produto cristalino, facilmente recuperado por filtração simples. Entretanto, a extração por solvente é outra técnica largamente empregada, sendo utilizados solventes como clorofórmio-metanol (Benincasa *et al*, 2002) e acetato de etila (Syldatk *et al.*, 1985). Turkovskaya *et al* (2001) avaliaram as técnicas de extração e precipitação utilizando clorofórmio, clorofórmio/HCl, clorofórmio/metanol, hexano e acetato de etila como solventes e etanol, etanol/ácido acético, acetona e HCl como agentes precipitantes. A eficiência do método foi

acompanhada através da determinação da tensão superficial e índice de emulsificação com querosene dos extratos e precipitados obtidos no meio de cultivo após separação da fase orgânica e no extrato redissolvido. Através da atividade emulsificante, verificou-se que os melhores solventes foram clorofórmio, acetato de etila e clorofórmio/metanol, pois os extratos redissolvidos forneceram tensões superficiais de 25,6; 24,5 e 25,6 mN/m, respectivamente. Entretanto, os meios de cultivo após a extração ainda apresentaram baixa tensão superficial (24,9 – 32,0 mN/m) e altos índices de emulsificação (em torno de 50%) indicando que a extração foi incompleta. De acordo com os autores, este resultado demonstrou que os solventes extraíram diferentes componentes do biosurfactante. Syldatk *et al* (1985) realizaram a caracterização de quatro ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas sp* DSM 2874 empregando acidificação e extração com solvente para recuperação dos ramnolipídeos a partir do meio de cultivo livre de células. O sobrenadante foi acidificado com H₂SO₄ 10 % a pH 2,0 e extraído com acetato de etila. O solvente foi removido em evaporador rotativo e o resíduo submetido a cromatografia em coluna empregando sílica gel 60 como adsorvente e uma solução clorofórmio-etanol cuja concentração variou de 20 : 1 a 1:1 (v/v). A purificação foi realizada em cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica gel 60 com um solvente constituído por clorofórmio, metanol, ácido acético e água destilada. O método permitiu a separação dos ramnolipídeos sintetizados por *Pseudomonas sp* DSM 2874. Shenck *et al* (1995) realizaram a precipitação dos ramnolipídeos com sulfato de alumínio, seguido de extração com acetato de etila, sendo empregada uma resina de troca iônica para purificação cromatográfica dos glicolipídeos. Benincasa *et al* (2004) utilizaram uma coluna cromatográfica com uma resina de poliestireno para separação dos ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* LB1 que foram identificados em HPLC-ES-MS.

Syldatk e Wagner (1987) utilizaram um sistema de remoção contínua de ramnolipídeos, empregando uma resina amberlite XAD 2 em um sistema com células de *Pseudomonas sp* DSM 2874 imobilizadas em reator tipo leito fluidizado.

2.6 – Co-produtos do Biodiesel

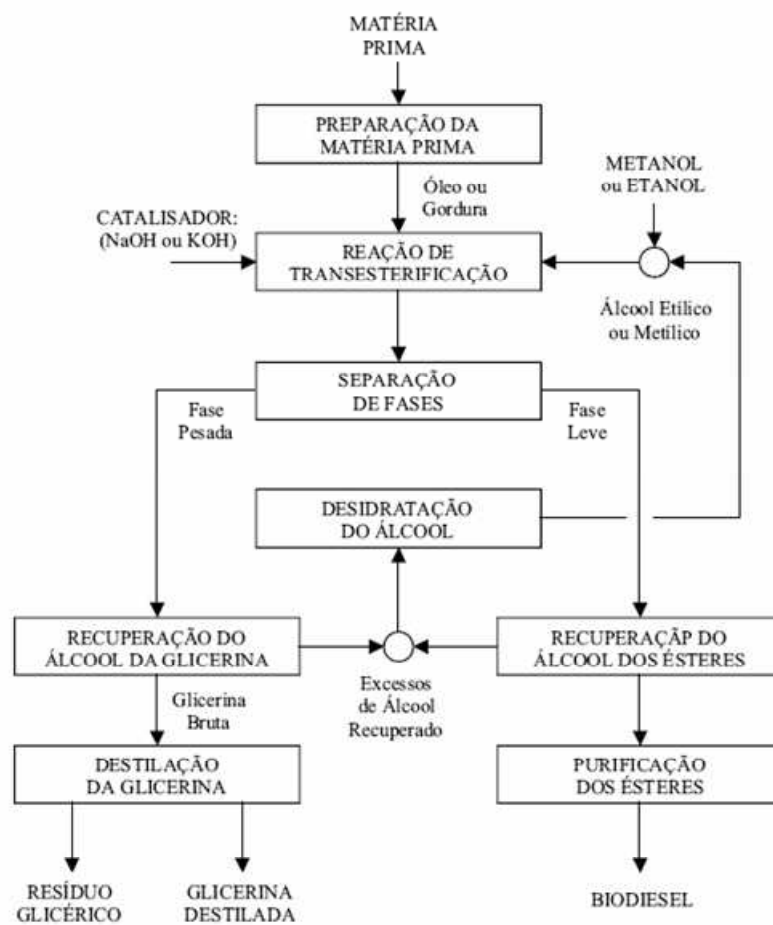
A cadeia produtiva do biodiesel gera como principais sub-produtos a glicerina, a lecitina, o farelo e a torta da oleaginosa. Estes devem ser foco de análises detalhadas, pois podem

constituir um fator determinante para a viabilidade econômica do biodiesel (Rathmann *et al.*, 2006).

O processo de purificação da glicerina é realizado através de destilação sob pressão reduzida, resultando em um produto límpido e transparente, denominado glicerina destilada ou bidestilada (Ávila Filho *et al.* 2006).

A queda do preço da glicerina devido ao aumento da sua oferta tem sido alvo de análises sobre o impacto nos mercados internacional e nacional. De acordo com estudo realizado por Tysson (2005) estima-se que o preço da glicerina pode cair de \$0,50/lb a \$0,35/lb até 2010. De acordo com algumas indústrias químicas nacionais, o preço médio da glicerina caiu de R\$ 3,00 o quilo, em 2005, para R\$ 1,60 atualmente, atingindo valores de até R\$ 0,60 o quilo em regiões onde usinas de biodiesel operam. Um levantamento realizado pela Associação Brasileira de Indústrias Químicas (Abiquim) encontrou que a capacidade de produção de indústrias de glicerina é de 35,8 mil toneladas ao ano, mas a produção situa-se em torno de 12,9 mil, para um consumo anual de 13,5 mil toneladas. Desse volume, 48,9% são destinados à produção de cosméticos, 14,5% são utilizados pela indústria farmacêutica, 11,9%, pelo setor de tintas e vernizes e o restante é vendido a outros segmentos (www.biodieselbr.com)

O biodiesel é produzido, primariamente, por alcoólise de triglicérides com metanol ou etanol. As matérias-primas para a produção de biodiesel são oleaginosas, tais como, algodão, amendoim, dendê, girassol, mamona, pinhão manso e soja, bem como, óleos de descarte, gorduras animais e óleos de fritura. Após período de decantação de 24 horas, obtém-se uma fase óleo, constituída por ésteres alquílicos (metílicos ou etílicos), e uma fase glicerínica, constituída por glicerol ou glicerina, principalmente, sabões, álcool (metanol ou etanol), hidróxidos, ácidos graxos e ésteres alquílicos, sendo a composição destes últimos função do tipo de oleaginosa utilizada (Ashby *et al.*, 2006). A proporção entre esses componentes é dependente do processo de transesterificação e da eficiência da separação do biodiesel (Ashby *et al.*, 2006). A Figura 4 apresenta um fluxograma deste processo.



Fonte: Parente, 2003.

Figura 4 – Fluxograma do processo de obtenção de biodiesel por transesterificação.

2.7 – Obtenção de Bioprodutos a partir do Resíduo Glicerinoso da Indústria do Biodiesel

O emprego de resíduos agrícolas constituídos por substratos simples, tais como carboidratos e lipídeos, são adequados ao crescimento de microrganismos e produção de metabólitos, como os biossurfactantes, tornando tais matérias-primas objeto de diversas pesquisas para a produção de surfactantes de origem microbiana (Benincasa *et al.*, 2002; Rahman *et al.*, 2002; Mercadé e Manresa, 1994).

Atualmente, a glicerina resultante da produção de biodiesel por transesterificação tem sido utilizada em processos fermentativos para a obtenção de diversos produtos. Segundo Kuo (2004), o *National Center for Agricultural Utilization Research* tem apresentado grande interesse

em aproveitar o glicerol como substrato para a produção de 3-hidroxi propionaldeído (3-HPA), ácido 3-hidroxi propiônico, 1,3-propanediol e ramnolipídeos.

Papanikolaou *et al.* (2000) avaliaram uma linhagem de *Clostridium butyricum* para a produção de 1,3-propanediol a partir da glicerina em cultivo em batelada e contínuo. Em ambos os cultivos obteve-se uma produção de 0,55 g de 1,3-propanediol para cada 1 g de glicerol consumido, atingindo uma produtividade volumétrica máxima de 3,4 g/Lh. O crescimento celular e a formação do produto foram semelhantes ao utilizar o glicerol PA e a glicerina, indicando que esta foi um substrato adequado para a linhagem avaliada. Ashby *et al.* (2005) também avaliaram o potencial desse sub-produto durante o cultivo misto em frascos agitados de *P. oleovorans* NRRL B-14682 e *P. corrugata* 388 para a produção de uma mistura de poli(3-hidroxi butirato) (PHB) e polihidroxi alcanoatos de cadeia média (PHA-cm). As linhagens apresentaram capacidade de produzir polímeros PHA a partir do glicerol sob as mesmas condições de crescimento, tornando possível o emprego de uma fermentação mista. Os autores ainda citam que a presença de ésteres, provenientes da glicerina, promoveram a miscibilidade dos polímeros PHA. Isto possibilita o controle de propriedades físico-químicas do polímero resultante.

A produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* a partir da glicerina bruta foi avaliada em cultivo em frascos agitados e comparada ao cultivo com glicose (Papanikolaou *et al.*, 2002). Os experimentos conduzidos com glicose e glicerina sob as mesmas condições de cultivo (razão C/N = 97 e meio tamponado) mostraram que o glicerol como fonte de carbono forneceu concentração de ácido cítrico e coeficientes de rendimento ($Y_{P/S}$) (11,9 g/L, 0,39 g/g) equivalentes a glicose (10,9 g/L e 0,38 g/g). Entretanto, em meio formulado com elevada concentração de glicerina (80 – 120 g/L) e sob limitação de nitrogênio (razão C/N = 261) foi atingida uma produção de 33 – 35 g/L de ácido cítrico e $Y_{P/S}$ de 0,42 – 0,44 g/g. Os autores ainda verificaram que o glicerol foi assimilado mais rapidamente que a glicose por *Y. lipolytica* em experimentos realizados com ambos os substratos como fonte de carbono. Desta forma, a produção de ácido cítrico e o crescimento de *Y. lipolytica* foram bem suportados ao empregar a glicerina bruta como fonte de carbono.

A produção de glicolipídeos a partir da glicerina foi avaliada por Ashby *et al* (2005). Foi utilizada uma linhagem de *C. bombicola* ATCC 22214 em um cultivo em batelada alimentada em biorreator de 2 L em meio de cultivo contendo 10 % (v/v) de glicerol PA e glicerina derivada

da transesterificação do óleo de soja, extrato de levedura 10 g/L e uréia 1 g/L. A composição da matéria-prima foi de 40 % de glicerol, 34 % de solúveis em hexano (ácidos graxos, ésteres de alquila, monoglicerídeos e diglicerídeos) e 26% de água. A produção de soforolipídeos a partir da glicerina foi cerca de 4 vezes maior do que a produção obtida com glicerol PA. O efeito do estresse osmótico causado pelo glicerol sobre a biossíntese do surfactante foi bastante evidente. Os compostos solúveis em hexano presentes na glicerina favoreceram a produção de glicolipídeos visto que estes podem ser usados na biossíntese do soforolipídeo, enquanto a fração de glicerol é utilizada para o crescimento celular. Portanto, a glicerina proveniente do biodiesel apresentou vantagens sobre a produção de glicolipídeos por *C. bombicola* ATCC 22214 com relação ao glicerol PA.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Caracterização da matéria-prima

Amostras de glicerina bruta e tratada por hidrólise ácida (ver tópico 3.2) foram caracterizadas quanto à presença de macro e micro elementos. Os micro elementos analisados foram cobre, ferro, manganês e zinco, bem como, cálcio e magnésio através de absorção atômica em equipamento Perkin Elmer Analyst 300. Enxofre e fósforo foram analisados por espectrofotometria de UV-visível em espectrofotômetro 600 plus. Todas as análises foram conduzidas em triplicata.

A viscosidade foi determinada de acordo com norma ASTM 445 de 2001 para produtos de petróleo. O método consiste em determinar o tempo para o qual um volume fixo de líquido escoar por gravidade através do capilar de um viscosímetro calibrado, a uma temperatura rigorosamente controlada. A viscosidade cinemática foi determinada pelo produto do tempo de escoamento, em segundos, pela constante de calibração do viscosímetro.

O teor de carbono total foi realizado em um analisador Shimadzu (TOC-V CPH/CPN), que utiliza a técnica de oxidação catalítica à alta temperatura. A amostra foi aspirada e injetada direto no catalisador. Este, por sua vez a 680 °C, transforma todo o carbono da amostra em CO₂. O CO₂ foi quantificado por infravermelho não dispersivo.

3.2 - Pré-tratamento da matéria-prima

A glicerina resultante da transesterificação do óleo de mamona foi fornecida pela Empresa Brasileira de Bioenergia Ind. Com. Ltda (EBB-NUTEC-CE). Após hidrólise ácida, à temperatura ambiente, com H₂SO₄ concentrado, a glicerina foi transferida para funil de separação onde permaneceu em repouso durante 24 horas para separação das fases glicerínica e ácido graxo. A glicerina foi utilizada para formulação do meio de cultivo para fermentação.

3.3 – Microrganismo

P. aeruginosa LAMI, proveniente da coleção de culturas do Laboratório de ecologia Microbiana e Biotecnologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, foi mantida em ágar nutritivo (peptona 5 g/L; extrato de carne 3 g/L, ágar 15 g/L) sob refrigeração (5 °C) e repicada a cada dois meses.

3.4 – Ensaio fermentativos

O inóculo foi obtido a partir de um cultivo de *P. aeruginosa* LAMI sob agitação de 150 rpm a 30 °C durante 18 horas em caldo nutritivo (extrato de carne 3 g/L, peptona 5 g/L). Após este período a densidade ótica foi determinada e, se necessário, ajustada para 1,25 com caldo nutritivo (Rocha *et al.*, 2006).

A glicerina e o meio com nutrientes foram esterilizados separadamente a 121 °C durante 15 minutos. O meio de fermentação foi suplementado com as seguintes fontes de nitrogênio, fósforo e magnésio: NaNO₃, KH₂PO₄ e MgSO₄.7H₂O. As concentrações variaram de acordo com os fatores e níveis avaliados nos planejamentos fatoriais completos 2^k, descritos a seguir, no item 3.5. No planejamento 2³, realizado inicialmente (Tabela 3), as concentrações de fósforo e magnésio foram: KH₂PO₄ (3,0 g/L) e MgSO₄.7H₂O (0,2 g/L). Para o estudo posterior, a concentração de MgSO₄.7H₂O permaneceu constante e a concentração dos demais nutrientes e condições ambientais seguiram os níveis do delineamento 2⁴ (Tabela 4).

Todos os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultivo a 150 rpm durante 96 horas. Após este período, o meio foi centrifugado a 10.000g por 15 minutos para separação de células e o sobrenadante utilizado para as determinações analíticas.

3.5 – Delineamento experimental

O estudo das condições nutricionais e ambientais sobre a produção de biossurfactante foi realizado de acordo com um delineamento fatorial completo 2^k. Por este método foi possível avaliar as influências de algumas variáveis experimentais, fatores e efeitos de interação sobre uma ou mais variáveis-resposta (Rodrigues *et al.*, 2006). Inicialmente, avaliou-se o efeito das

concentrações de glicerina, nitrato e tamanho do inóculo sobre a produção de biossurfactantes e tensão superficial, cujos níveis estão apresentados na Tabela 3. Os níveis avaliados foram determinados de acordo com dados da literatura (Santa Anna *et al*, 2002).

Tabela 3 – Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^3 utilizado no estudo da influência da concentração de glicerol, nitrato e tamanho de inóculo na produção de biossurfactante por *P. aeruginosa* LAMI cultivada a 30 °C, 150 rpm e pH 5,4.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
x_1 - Concentração de glicerina (% v/v)	2	5	8
x_2 - Concentração de NaNO_3 (g/L)	0,5	1,45	2,4
x_3 - Tamanho do inóculo (% v/v)	1	2	3

A partir da análise de efeitos obtida por este planejamento, os fatores concentração de glicerina e tamanho do inóculo foram fixados. O estudo sobre as condições de cultivo foi complementado através da avaliação da concentração de fosfato, concentração de nitrogênio, pH e temperatura através de um delineamento fatorial completo 2^4 . Nesta etapa, avaliou-se o crescimento celular, a produção de biossurfactante e a tensão superficial final como variáveis-resposta. A Tabela 4 apresenta os níveis estudados para cada fator. O aumento da concentração de NaNO_3 foi baseado nos resultados obtidos no planejamento 2^3 , bem como, os níveis avaliados para a concentração de fosfato foram estabelecidos com base em dados da literatura (Santos, 2003). O pH do meio foi ajustado com uma solução de KOH 3,0 M. A análise dos dados foi realizada através do *software* Statistica 6.0. Em ambos os planejamentos realizou-se triplicata no ponto central.

Tabela 4 – Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^4 utilizado no estudo da influência de condições de cultivo sobre a produção de biomassa, produção de biossurfactante e tensão superficial por *P. aeruginosa* LAMI cultivada sob agitação de 150 rpm.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
x_1 - Concentração de NaNO_3 (g/L)	2,4	3,2	4,0
x_2 - Concentração de KH_2PO_4 (g/L)	8,43	17,8	27,2

x ₃ – pH	4,6	5,8	7,0
x ₄ – Temperatura (°C)	30	33,5	37

3.6 – Efeito de diferentes fontes de nitrogênio

Foram avaliadas três fontes de nitrogênio, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄ e peptona, sobre a produção de biossurfactantes e crescimento celular de *P. aeruginosa* LAMI. Os ensaios foram realizados durante 96 horas em frascos erlenmeyer de 250 mL sob agitação de 150 rpm contendo 50 mL de meio de cultivo cuja composição foi, em g/L: KH₂PO₄, 3,0, K₂HPO₄ 7,0 g/L, MgSO₄.7H₂O, 0,2, C₃H₈O₃, 46,3, fonte de nitrogênio 2,4 e pH 7,0. Após o período de incubação foram determinados a densidade ótica e o teor de ramnose.

3.7 – Estudo da cinética de produção de biossurfactante e crescimento celular

Os ensaios para avaliação da cinética de crescimento celular e produção de biossurfactante foram realizados a 37 °C e 150 rpm em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo. A composição do meio foi, em g/L: KH₂PO₄ 8,43, MgSO₄.7H₂O 0,2 e pH 7,0. As concentrações de NaNO₃ foram variadas em 1,0; 1,45; 2,4 e 4,0 g/L e a concentração de glicerina foi de 5 % (v/v) e inóculo de 2 % (v/v), obtido como descrito anteriormente (item 3.4). Alíquotas foram retiradas em intervalos de 24 horas, e seguiram para as determinações analíticas de densidade ótica, ramnose e pH.

3.8 – Determinação do Crescimento Celular

O crescimento celular foi obtido utilizando um método indireto por determinação da turbidez que é proporcional a densidade celular e, a fim de relacionar a turbidez com a concentração de biomassa em g/L, obteve-se uma curva de calibração com descrito a seguir. *P. aeruginosa* LAMI foi cultivada em caldo nutritivo sob agitação de 150 rpm a 30 °C durante 72 horas. Em seguida, separou-se a biomassa por centrifugação a 10000g durante 10 minutos, seguindo-se de três lavagens com água. A biomassa foi transferida para um cadinho previamente tarado e prosseguiu a secagem em estufa a 60 °C até peso constante. Prepararam-se suspensões-padrão através de diluições seriadas e determinou-se a absorbância a 600 nm em espectrofotômetro Spectronic® 20 Genesys.

3.9 – Métodos Analíticos

3.9.1 – Determinação de Ramnose

A determinação de ramnose, uma forma direta de quantificação de ramnolipídeos, foi realizada através do método orcinol-sulfúrico, descrito por Pham *et al.* (2004). A solução de orcinol, a 0,19 % (p/v), foi preparada dissolvendo este reagente em uma solução de ácido sulfúrico a 53 % (v/v). O método consistiu em adicionar 0,9 mL desta solução a uma alíquota de 0,1 mL de amostra, seguido de aquecimento a 80 °C durante 30 minutos. Após 15 minutos, determinou-se a absorvância em espectrofotômetro Spectronic® 20 Genesys a 421 nm. A curva-padrão foi obtida com soluções de ramnose com concentrações conhecidas, entre 5 e 50 mg/L.

3.9.2 – Determinação de Glicerol

A concentração de glicerol foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Utilizou-se um cromatógrafo da marca Waters® acoplado a um detector de índice de refração e coluna SHODEX SC 1011. A fase móvel foi água MiliQ a uma vazão de 0,6 mL/min a 80 °C e o volume de injeção foi 5 µL.

3.10 – Caracterização do Biossurfactante

3.10.1 - Índice de Emulsificação

O índice de emulsificação foi determinado de acordo com Cooper e Goldenberg (1987), utilizando 2 mL de querosene comercial e 2 mL de meio de cultivo livre de células. A mistura foi agitada em agitador tipo vortex durante 1 min. O índice de emulsificação foi determinado após 24 horas, de acordo com a equação (1), proposta por Wei *et al.*, 2005:

$$IE_{24}(\%) = \frac{H_{FE}}{H_{total}} \times 100 \quad (1)$$

sendo H_{FE} a altura da fase emulsionada.

3.10.2 – Tensão Superficial

A tensão superficial, uma medida indireta da produção de biossurfactantes, foi determinada no meio livre de células utilizando um Tensiômetro (Krüss K6) a 25 °C. As medidas foram realizadas em triplicata.

3.10.3 - Atividade Emulsificante

A atividade emulsificante foi determinada de acordo com metodologia descrita por Cirigliano e Carman (1985) com pequenas modificações. As amostras foram filtradas em membrana Millipore 0,45 µm. O filtrado (1 mL) foi colocado em tubos de vidro (15 por 125 mm) e diluído com 1mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 3,6); em seguida, adicionou-se 0,5 mL de querosene e o tubo foi submetido a agitação em agitador de tubos tipo vortex, em velocidade máxima. A emulsão resultante permaneceu em repouso por 10 minutos; em seguida, a absorbância da fase aquosa foi medida em espectrofotômetro Spectronic® 20 Genesys. Uma unidade de atividade emulsificante foi definida como a quantidade de biossurfactante que mudou a absorbância da fase aquosa a 540nm (A_{540}) por 1,0 nas condições descritas anteriormente.

3.11 – Extração e purificação do biossurfactante

3.11.1 – Extração líquido-líquido

A extração de biossurfactante foi realizada no meio de cultivo livre de células, previamente removidas por centrifugação a 10000g por 15 minutos. O pH do meio foi ajustado para 2,0 com H₂SO₄ 6 N e mantido sob refrigeração (5 °C) por 12 h (*overnight*). Após este período, o meio foi centrifugado a 3500 rpm por 20 minutos e o precipitado resultante foi lavado três vezes com água destilada e armazenado. O sobrenadante foi submetido a extração com uma mistura de CHCl₃ e CH₃OH (2:1 v/v).

3.11.2 – Cromatografia em coluna e em camada delgada

Para realização de cromatografia em coluna o extrato obtido a partir da extração líquido-líquido descrita anteriormente foi utilizado para separação dos constituintes. Na cromatografia em coluna, Sílica Gel 60 foi utilizada como fase estacionária e uma mistura clorofórmio-metanol, cuja razão variou de 20:1 a 1:1 (v/v), foi utilizada como eluente. Os compostos isolados foram purificados em cromatografia em camada delgada sobre sílica (cromatofolhas), sendo o eluente composto por uma mistura de clorofórmio, metanol e ácido acético (65:15:2) (Syldatk *et al.*, 1985). A presença de glicolipídeos foi identificada por uma solução de vanilina, após aquecimento em chapa a 100 °C. Realizou-se espectro de ressonância magnética nuclear H^1 com CD_3OD como solvente para um dos compostos purificados a partir da cromatografia em coluna.

3.12 – Cálculo da Razão C/N

O cálculo da razão C/N foi baseado na determinação da quantidade de carbono na fórmula química do glicerol ($C_3H_8O_3$), correspondente a 39,1 %, e na quantidade de nitrogênio na fórmula química do $NaNO_3$, equivalente a 19,2 %. Assim, calculou-se as concentrações de carbono e de nitrogênio multiplicando-se as proporções percentuais pelas respectivas concentrações de glicerol e de nitrato de sódio.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Caracterização da matéria-prima

Foi realizada a caracterização física e química da glicerina bruta e tratada (ver tópico 3.2), cujos dados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Caracterização de macro e microelementos da glicerina bruta e tratada resultante da transesterificação do óleo de mamona.

Elementos	Glicerina Bruta	Glicerina Tratada
Ferro (ppm)	5,369 ± 0,127	5,163 ± 0,146
Zinco (ppm)	12,308 ± 0,604	23,628 ± 0,551
Cobre (ppm)	ND	ND
Manganês (ppm)	ND	ND
Cálcio (g/Kg)	61,481 ± 3,898	52,856 ± 4,770
Magnésio (g/Kg)	45,167 ± 0,672	58,941 ± 3,595
Enxofre (g/Kg)	ND	5,693 ± 1,359
Fósforo (g/Kg)	13,22 ± 0,668	ND
Carbono Total (mg/L)	306.800	288.350

A composição da glicerina bruta e tratada diferiu em poucos elementos. Os teores de ferro, cálcio e magnésio permaneceram próximos após a hidrólise ácida. O teor de enxofre aumentou na glicerina tratada devido a grande formação de sulfato de sódio, resultado da reação entre os sais de ácido graxo (sabões) e o H₂SO₄. As concentrações de cobre e manganês ficaram abaixo do limite de detecção do equipamento para todas as amostras avaliadas. O teor de fósforo foi reduzido para abaixo do limite de detecção após o tratamento ácido, sendo inicialmente equivalente a 13,22 ± 0,668 (g/Kg) na glicerina bruta. O teor de carbono total foi maior para a glicerina bruta com relação a tratada devido, provavelmente, à presença de fontes de carbono mais complexas, tais como, ésteres metílicos, ácidos graxos e ésteres de glicerol.

A caracterização da matéria-prima forneceu importantes dados que auxiliaram na formulação do meio de cultivo. A partir dos resultados (Tabela 5) pode-se observar que a glicerina tratada contém nutrientes importantes para o crescimento e produção de glicolípídeos por bactérias do gênero *Pseudomonas*, tais como, ferro, zinco, cálcio, magnésio e enxofre (Sylđatk *et al*, 1985; Benincasa *et al*, 2002). De acordo com dados da literatura (Santa Anna *et al*, 2002) o requerimento desses nutrientes varia de acordo com a linhagem. Entretanto, a concentração desses micronutrientes segue, geralmente, uma ordem de grandeza de ppm (Manresa *et al*, 1991). A suplementação de fósforo foi necessária, visto que a presença deste nutriente não foi detectada na glicerina tratada (Tabela 5). Neste trabalho, a avaliação preliminar da matéria-prima como fonte de carbono e de nutrientes para o crescimento de *Pseudomonas sp* LAMI foi realizada através do planejamento fatorial 2³, descrito no item 3.5 Tabela 3, cujos resultados estão apresentados no item 4.2.1.

As viscosidades cinemáticas a 40 °C também foram determinadas para ambas as matérias-primas. A Tabela 6 apresenta os valores.

Tabela 6 – Viscosidades cinemáticas a 40 °C das glicerinas bruta e tratada de acordo com norma ASTM 445 para produtos de petróleo.

Matéria-prima	Viscosidade (cSt)
Glicerina bruta	105,9
Glicerina tratada	11,70

Pode-se verificar que o tratamento ácido reduziu em torno de 10 vezes a viscosidade da glicerina bruta. Provavelmente, o aumento do teor de água e a separação do material lipídico através da quebra da emulsão formada a partir dos sabões provenientes da reação de transesterificação, promoveram a redução da viscosidade.

4.2 – Estudo das condições de cultivo através de delineamento experimental fatorial

4.2.1 – Influência da concentração de glicerol e de NaNO₃ sobre a produção de biossurfactantes

O conhecimento da influência da concentração de glicerol em processos fermentativos submersos consiste em um fator importante para o crescimento de microrganismos devido ao elevado estresse osmótico que esta fonte de carbono causa em meios líquidos (Syldatk *et al.*, 1985). Além disso, a influência da razão C/N é outro fator importante sobre a produção de biossurfactantes (Santa Anna *et al.*, 2000). O efeito da limitação de nutrientes para a produção de biossurfactantes tem sido estudado devido a sua importância sobre a lipogênese microbiana (Kosaric, 1992). Geralmente, o acúmulo de lipídeo intracelular é favorecido quando há limitação de algum nutriente no meio de cultivo. A limitação mais comumente utilizada é a limitação de nitrogênio. Baseado nestas informações estudou-se o efeito de alguns fatores sobre a produção de biossurfactante, através da variação na tensão superficial do meio e da concentração de ramnose. A Tabela 7 mostra os resultados obtidos.

Tabela 7 – Matriz de resultados obtidos a partir de um planejamento fatorial 2^3 do cultivo de *P. aeruginosa* LAMI a 150 rpm e temperatura de 30 °C durante 96 horas e meio de cultivo cuja composição foi (g/L): KH_2PO_4 3,0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 e pH 5,4.

Ensaio	Glicerol (% v/v)	Nitrato (g/L)	Inóculo (% v/v)	Ramnose (mg/L)	Tensão Superficial (mN/m)	pH Final
1	2	0,5	1	490,94	30,0	6,26
2	2	2,4	1	1632,49	33,0	7,26
3	8	0,5	1	284,69	29,5	5,99
4	8	2,4	1	489,90	33,5	7,13
5	2	0,5	3	711,83	30,8	6,35
6	8	0,5	3	1232,6	29,0	5,04
7	2	2,4	3	1580,0	33,1	7,22
8	8	2,4	3	804,64	32,9	7,67
9	5	1,45	2	1346,2	30,5	7,14
10	5	1,45	2	984,3	30,5	7,13
11	5	1,45	2	1037,81	30,0	7,12

Uma análise estatística dos dados mostrados na Tabela 7 foi realizada e a Figura 5 apresenta o diagrama de Pareto, que indica os efeitos dos fatores estudados sobre a produção de biossurfactante. De acordo com Garrido-Lopez e Tena (2005), o comprimento da barra é proporcional ao valor absoluto dos efeitos estimados e a linha pontilhada representa o intervalo de confiança, que neste trabalho foi de 90 %. Efeitos que atravessam esta linha são significantes em relação à resposta. Assim, observou-se que o efeito de interação entre a concentração de glicerol e a concentração de NaNO_3 (razão C/N) foi o mais significativo. O volume de inóculo não apresentou efeito significativo para uma probabilidade de 90 %. A concentração de glicerol, isoladamente, também não foi um fator significativo, entretanto, exerceu um efeito negativo sobre a produção de glicolipídeos, provavelmente devido ao efeito do estresse osmótico (Syldatk *et al.*, 1985). O diagrama de contorno gerado através do ajuste de um modelo polinomial apresentado na Figura 6, utilizado apenas para verificar as tendências apresentadas pelos fatores estudados sobre a produção de biossurfactantes, mostra que a região que favorece a maior produção de biossurfactante encontra-se delimitada pelo nível inferior de glicerina (2 %) e superior de nitrato (2,4 g/L) em que se obteve a produção máxima (1,6 g/L). Observou-se, ainda, que a concentração de micronutrientes obtida com o nível inferior de glicerina (2 %) foi suficiente para a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* LAMI. Assim, observando-se que o aumento da concentração de nitrato favorecia a produção de ramnolipídeo e com a finalidade de otimizar a razão C/N, optou-se em variar novamente a concentração de NaNO_3 no próximo planejamento, utilizando maiores valores de concentração.

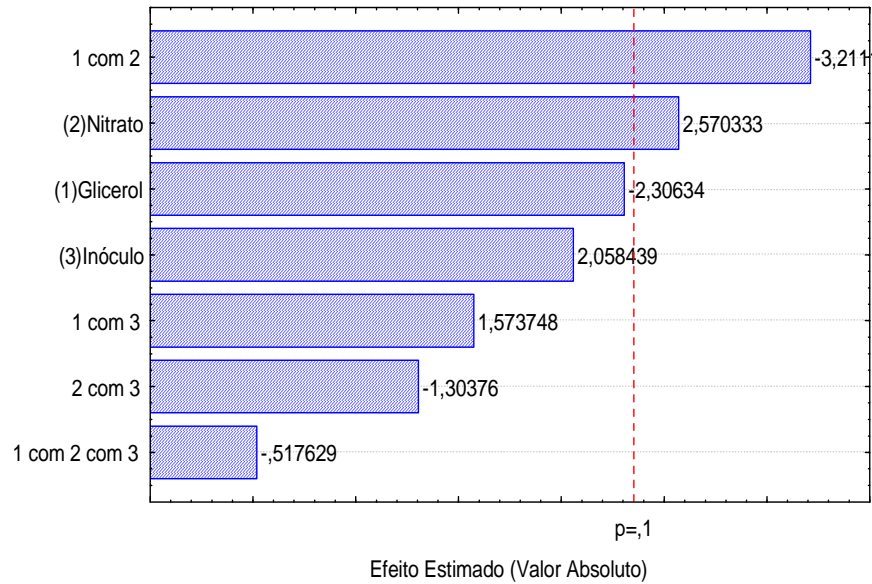


Figura 5 - Diagrama de Pareto para a produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* LAMI a 150 rpm e temperatura de 30 °C durante 96 horas.

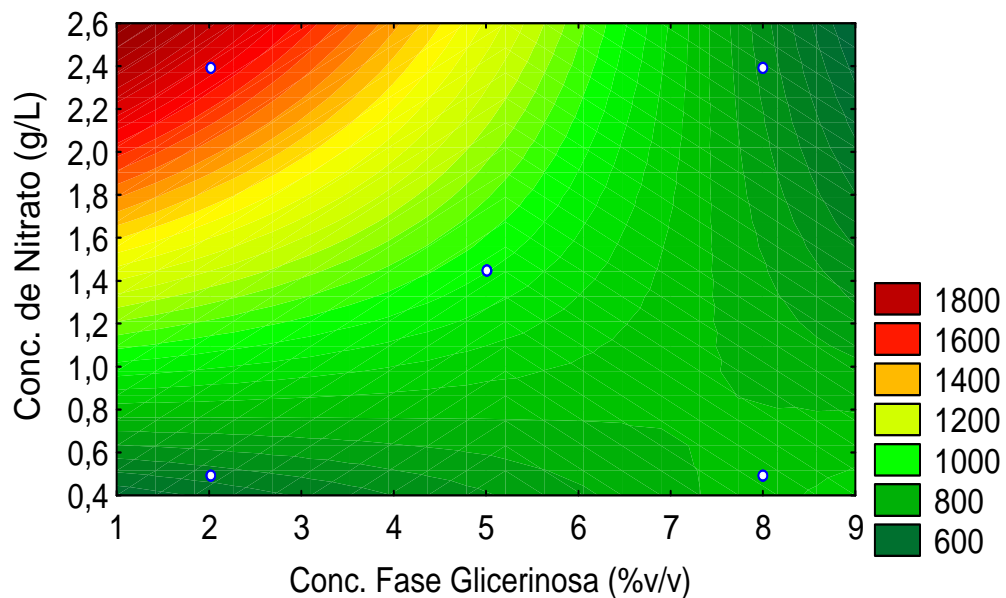


Figura 6 - Superfície de resposta gerada através do ajuste de um modelo polinomial para a variável-resposta produção de biossurfactante a partir do cultivo de *P. aeruginosa* LAMI a 150 rpm e 30 °C.

A Figura 7 mostra os efeitos sobre a tensão superficial determinada no meio de cultivo livre de células. A concentração de nitrato foi o único efeito significativo sobre esta variável-resposta, indicando que a redução da sua concentração promove uma redução da tensão superficial. Ao contrário, os ensaios que apresentaram maior atividade emulsificante foram aqueles realizados com maior concentração de nitrato o que pode ser verificado na Figura 8 através do índice de emulsificação com querosene.

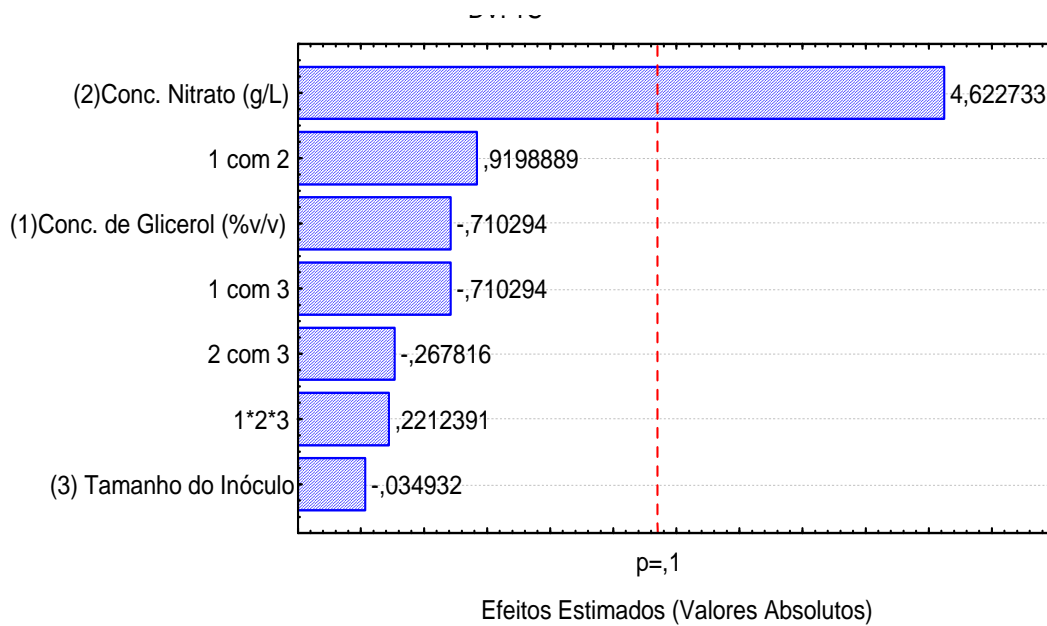


Figura 7 - Diagrama de Pareto para a variável-resposta tensão superficial obtido através do cultivo de *P. aeruginosa* LAMI a 150 rpm e 30 °C durante 96 horas de acordo com um planejamento fatorial $2^3 + 3$.

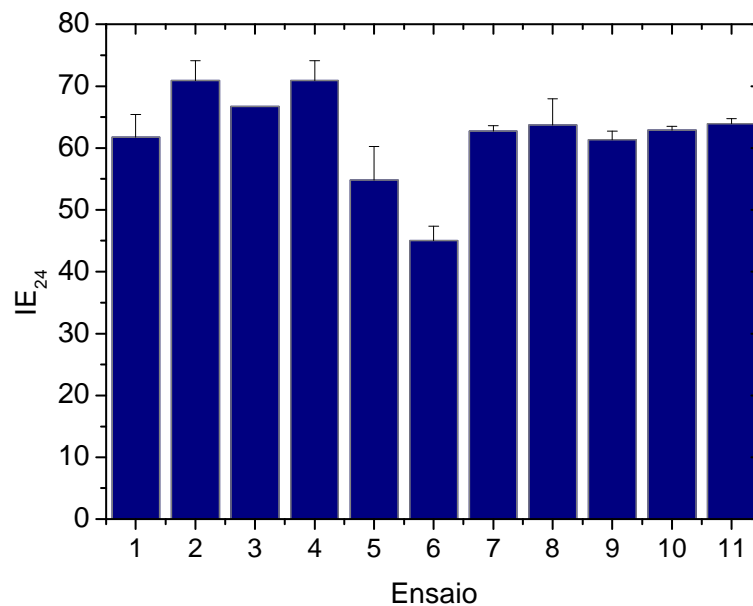


Figura 8 - Índice de emulsificação com querosene realizado com meio de cultura livre de células obtido a partir do cultivo de *P. aeruginosa* LAMI a 150 rpm e 30 °C durante 96 horas.

A partir dos resultados obtidos, selecionou-se concentração de 2 % (v/v) de fase glicerínica e inóculo de 2 % (v/v) para estudos posteriores. A fim de verificar o efeito da concentração de fosfato, do pH e da temperatura, bem como, do aumento da concentração de NaNO_3 sobre a produtividade de biossurfactante, realizou-se um planejamento fatorial completo avaliando como variáveis-respostas a concentração de biossurfactante, a tensão superficial e o crescimento celular.

4.2.2 - Avaliação da influência da concentração de fosfato e de NaNO_3 , do pH e da temperatura sobre a produção de biossurfactante

A tensão superficial representa a tensão existente entre um líquido e o ar. O valor mínimo de tensão superficial é um indicativo da eficiência de um surfactante (Fiechter, 1992), além de ser uma medida indireta da produção de tensoativos no meio de cultivo. Neste contexto, foram avaliados os efeitos dos fatores concentração de fosfato e de NaNO_3 , do pH e da temperatura sobre as propriedades superficiais e interfaciais dos surfactantes obtidos, através da análise da tensão superficial. Além das condições de cultivo, a disponibilidade de nutrientes no meio também influencia no tipo e na quantidade de surfactante produzido (Syldatk *et al*, 1985;

Benincasa *et al*, 2002). Portanto, um Planejamento Fatorial Completo 2^4 foi utilizado para estudar o efeito de condições nutricionais e de cultivo sobre a quantidade de biossurfactante produzido, medida através da concentração de ramnose. Foram realizados 19 experimentos como descrito no item 2.3, Tabela 4 (matriz de planejamento com os fatores e níveis estudados). A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos para produção de biomassa, produção de biossurfactantes e tensão superficial.

Tabela 8 – Matriz de resultados da produção de biossurfactante, crescimento celular, tensão superficial final, pH e consumo de glicerol obtidos após 96 horas de cultivo de *P. aeruginosa* LAMI a 150 rpm de acordo com um Planejamento Fatorial $2^4 + 3$.

Ensaio	NaNO ₃ (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	pH	Temperatura (°C)	Biomassa (g/L)	Ramnose (mg/L)	Tensão Superficial Final (mN/m)	pH final	Consumo de Glicerol (%)
1	2,4	8,43	4,60	30,0	0,710	718,56	30,07	6,20	79,56
2	4,0	8,43	4,60	30,0	0,699	573,85	30,83	5,20	55,24
3	2,4	27,2	4,60	30,0	0,118	0	46,00	4,70	17,94
4	4,0	27,2	4,60	30,0	0,132	0	47,43	4,80	24,83
5	2,4	8,43	7,00	30,0	0,768	1138,22	33,00	7,54	67,22
6	4,0	8,43	7,00	30,0	0,762	1037,92	33,17	7,76	86,47
7	2,4	27,2	7,00	30,0	0,688	664,67	31,17	7,00	77,98
8	4,0	27,2	7,00	30,0	0,772	1009,98	31,07	6,91	78,02
9	2,4	8,43	4,60	37,0	0,417	128,24	34,97	5,10	23,48
10	4,0	8,43	4,60	37,0	0,483	589,82	36,87	5,30	27,69
11	2,4	27,2	4,60	37,0	0,001	0	38,33	4,70	1,65
12	4,0	27,2	4,60	37,0	0,000	0	37,63	4,60	0,16
13	2,4	8,43	7,00	37,0	0,676	1694,61	33,90	7,90	94,25
14	4,0	8,43	7,00	37,0	0,610	1908,18	34,00	8,28	100,00
15	2,4	27,2	7,00	37,0	0,638	698,60	31,67	7,10	61,84
16	4,0	27,2	7,00	37,0	0,580	1018,46	31,50	7,30	73,17
17	3,2	17,8	5,80	33,5	0,408	871,75	34,57	5,46	54,57
18	3,2	17,8	5,80	33,5	0,419	934,13	35,33	5,44	65,42
19	3,2	17,8	5,80	33,5	0,555	961,07	35,00	5,39	65,26

Uma análise direta dos resultados mostrou que duas condições (Ensaio 11 e 12) não favoreceram o crescimento da *P. aeruginosa* LAMI em meio de cultivo contendo como fonte de carbono, o glicerol, principal constituinte da glicerina bruta proveniente do processo de produção de biodiesel. Porém a 30 °C, houve discreto crescimento celular (Ensaio 3 e 4). O favorecimento do crescimento celular a 30 °C comparativamente aos ensaios realizados a 37 °C ocorreu em todos os ensaios. Houve aumento do pH ao final do cultivo na maioria dos ensaios, com exceção daqueles em que o crescimento foi discreto ou ausente (ensaio 3, 4, 11 e 12) e para os pontos centrais, onde ocorreu pequena redução do pH.

Verificou-se ainda que a redução do pH inicial do meio de cultivo resultou em menores tensões superficiais, atingindo um valor mínimo de 30 mN/m (Tabela 8), e o aumento da temperatura promoveu uma redução desta variação. Nos ensaios 3 e 4 observou-se que a tensão superficial foi maior do que nos ensaios 11 e 12. Este resultado pode ser atribuído ao consumo de fontes de carbono de origem lipídica, resultantes da glicerina e que possuem caráter tensoativo, nos ensaios em que houve crescimento celular (Tabela 8, ensaios 3 e 4), o que não ocorreu nos ensaios 11 e 12, cujo crescimento celular foi ausente. Temperatura e pH são fatores relatados na literatura por interferir na biossíntese seletiva de ramnolipídeos em *P. aeruginosa*, obtendo-se, assim, uma mistura de diferentes proporções de moléculas desses surfactantes. Sildatk *et al.* (1985), verificaram que a mistura de ramnolipídeos sintetizados por *resting cells* de *Pseudomonas* sp. DSM 2874 utilizando glicerol e n-alcenos como fontes de carbono foi influenciada pela temperatura, em que moléculas de caráter mais hidrofílico (R2 e R4), cujas cadeias carbônicas laterais são menores que os respectivos R1 e R3, foram sintetizados em temperaturas abaixo de 37 °C sendo que, as propriedades tensoativas variaram em função desta síntese seletiva. As moléculas de caráter mais hidrofílico apresentaram valores maiores de concentração micelar crítica (CMC) e promoveram uma menor redução da tensão superficial da água, do que as moléculas de caráter mais hidrofóbico. Santos (2003), ao estudar a produção de biosurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 a partir de glicerol, verificou que a variação do pH interferiu na síntese relativa de moléculas de mono e di-ramnolipídeos, sendo que os diramnolipídeos foram sintetizados em maior proporção do que os monoramnolipídeos em pH ácido (5,66) até a neutralidade e, em meio básico esta proporção foi de, aproximadamente, 1:1. Portanto, baseados nestas informações da literatura e nos resultados experimentais obtidos, menores valores de tensão superficial (30 mN/m) com pH inicial de 4,6, acredita-se que o

microrganismo produziu diferentes moléculas de surfactante dependo da condição de cultivo adotada.

A Figura 9 mostra os resultados de produção de biomassa e de biosurfactante e consumo de glicerol para todos os ensaios. Observou-se que o consumo de glicerol foi proporcional à produção de biosurfactante e ao crescimento celular.

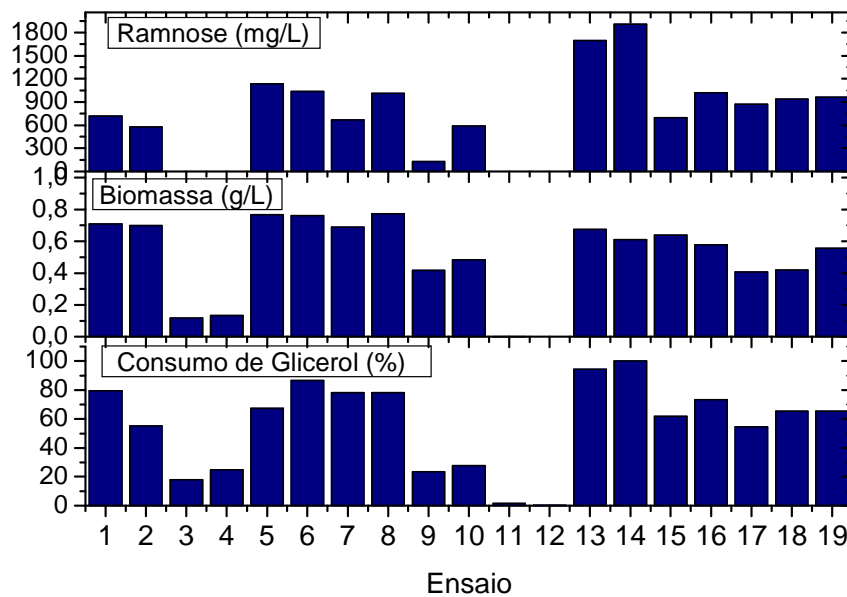


Figura 9 – Resultados de produção de biomassa e de biosurfactante e consumo de glicerol para os ensaios realizados com *P. aeruginosa* LAMI de acordo com planejamento fatorial $2^4 + 3$.

A Tabela 9 mostra os coeficientes de rendimento $Y_{P/S}$ (Coeficiente de rendimento expresso através da razão entre a quantidade de produto formado e quantidade de substrato consumido), $Y_{P/X}$ (Coeficiente de rendimento expresso através da razão entre a quantidade de produto e de biomassa formados) e produtividade (Q_p) para os ensaios em que houve crescimento e produção de surfactante. Os ensaios que apresentaram maiores coeficientes de rendimento $Y_{P/S}$ foram os ensaios 10 e 14 (Tabela 9), entretanto, no ensaio 10 a produtividade volumétrica foi, aproximadamente, 1/3 daquela obtida no ensaio 14, que também apresentou maior valor de $Y_{P/X}$. Assim, a condição em que se obteve um bom rendimento, em termos de concentração de substrato ($Y_{P/S} = 0,103$ g/g), e de biomassa ($Y_{P/X} = 3,129$ g/g), e produtividade

elevada ($Q_P = 19,88$ mg/Lh) foi a do ensaio 14 (Tabela 9). Esses resultados obtidos em fermentação em frascos agitados estão próximos daqueles obtidos na literatura (Tabela 10).

Tabela 9 – Coeficientes de rendimento para os ensaios obtidos a partir do planejamento fatorial 2^4 após 96 horas de cultivo de *P. aeruginosa* LAMI a 150 rpm com glicerol como fonte de carbono.

Ensaio	NaNO ₃ (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	pH	Temperatura	Y _{P/S} (g/g)	Y _{P/X} (g/g)	Q _P (mg/Lh)
1	2,4	8,43	4,60	30,0	0,049	1,012	7,49
2	4,0	8,43	4,60	30,0	0,056	0,821	5,98
5	2,4	8,43	7,00	30,0	0,091	1,482	11,86
6	4,0	8,43	7,00	30,0	0,065	1,363	10,81
7	2,4	27,2	7,00	30,0	0,046	0,966	6,92
8	4,0	27,2	7,00	30,0	0,070	1,308	10,52
9	2,4	8,43	7,00	37,0	0,029	0,308	1,34
10	4,0	8,43	7,00	37,0	0,115	1,222	6,14
13	2,4	8,43	7,00	37,0	0,097	2,508	17,65
14	4,0	8,43	7,00	37,0	0,103	3,129	19,88
15	2,4	27,2	7,00	37,0	0,061	1,094	7,28
16	4,0	27,2	7,00	37,0	0,075	1,757	10,61
17	3,2	17,8	5,80	33,5	0,086	2,137	9,08
18	3,2	17,8	5,80	33,5	0,077	2,229	9,73
19	3,2	17,8	5,80	33,5	0,079	1,732	10,01

Tabela 10 – Coeficientes de rendimento ($Y_{P/X}$) e produtividades volumétricas (Q_P) para a produção de biossurfactantes por espécies de *Pseudomonas*.

Microrganismo	Fonte de carbono	Y _{P/X} (g/g)	Q _P (mg/Lh)	Referência
<i>P. aeruginosa</i> 44T1	Óleo de oliva	2,38	20,0	Manresa <i>et al.</i> 1991
<i>P. aeruginosa</i> PA1	Glicerol	0,488	18,0	Santos, 2003

I – Análise de Efeitos

Os dados da Tabela 9 foram analisados estatisticamente e a Figura 10 mostra o Diagrama de Pareto para efeitos padronizados, obtido através do *Software* Statistica 6.0, para a produção de biomassa por *P. aeruginosa* LAMI.. Observou-se que as variáveis concentração de fosfato e pH apresentaram efeitos principais significativos, bem como o efeito de interação entre estes. Nitrato e temperatura não apresentaram efeitos significativos dentro do intervalo estudado.

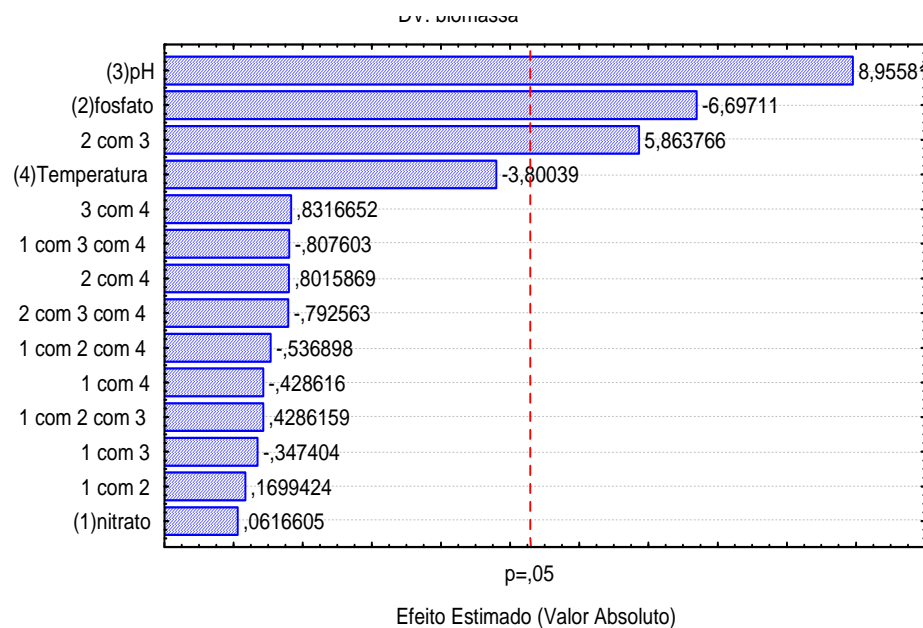


Figura 10 – Efeitos principais e de interação obtidos a partir da relação entre os fatores concentração de nitrato, concentração de fosfato, pH e temperatura através de um Planejamento Fatorial Completo $2^4 + 3$ para a produção de biomassa por *P. aeruginosa* LAMI.

O efeito negativo da concentração de fosfato deveu-se, provavelmente, ao aumento da pressão osmótica do meio de cultivo devido à elevada concentração de sais. D'Souza-Ault et al. (1993) estudaram o efeito do estresse osmótico através da adição de sais durante o cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 e verificaram a redução da taxa específica de crescimento mediante a adição crescente de NaCl. Nos ensaios 3 e 4 (ver Tabela 9), entretanto, houve discreto crescimento celular, mostrando que esse efeito pareceu ser dependente da temperatura.

O pH foi o fator que exerceu maior efeito significativo sobre o crescimento celular (Figura 10). A faixa de pH ótimo de crescimento de espécies de *Pseudomonas* varia de acordo com a literatura entre 6,0 e 6,5 (Nitschike *et al.*, 2005).

O único efeito de interação significativo ocorreu entre a concentração de fosfato e o pH. Pode-se verificar através da análise das médias marginais (Figura 11) que para pH 4,6 o efeito do aumento da concentração de fosfato exerceu maior influência sobre a concentração de biomassa do que a pH 7,0. Desta forma, verificou-se que a condição em que foi utilizada uma concentração de 27,2 g/L de KH_2PO_4 e pH 4,6 não permitiu crescimento celular. Isto se deve, provavelmente, ao efeito do pH sobre a assimilação de fósforo que constitui um nutriente essencial para o crescimento de microorganismos.

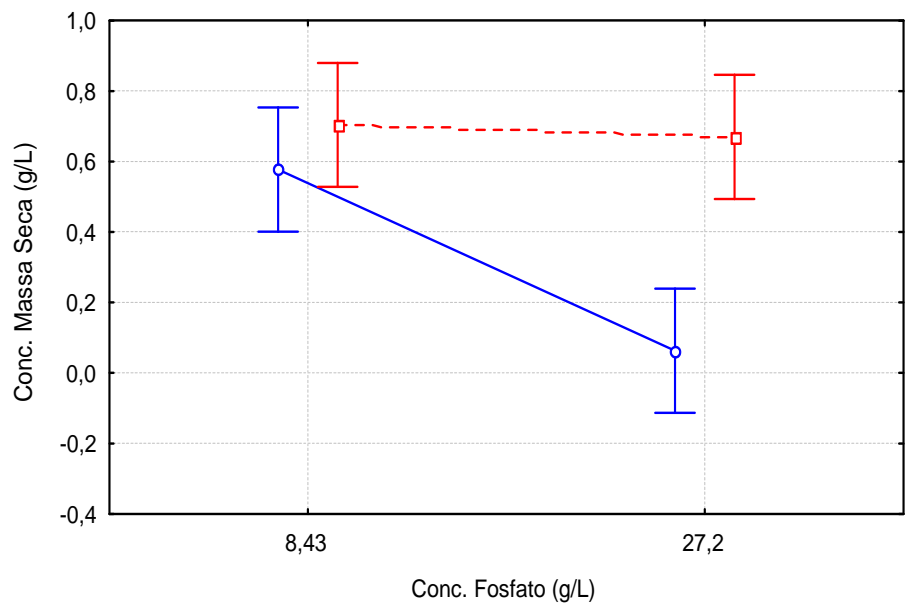


Figura 11 – Médias marginais obtidas para os fatores concentração de fosfato e pH para a variável-resposta produção de biomassa (pH 4,6 -o-; pH 7,0 - -).

A análise dos efeitos dos fatores concentração de fosfato e de NaNO_3 , do pH e da temperatura sobre a tensão superficial obtida após 96 horas de cultivo é apresentada na Figura 12, através do diagrama de Pareto.

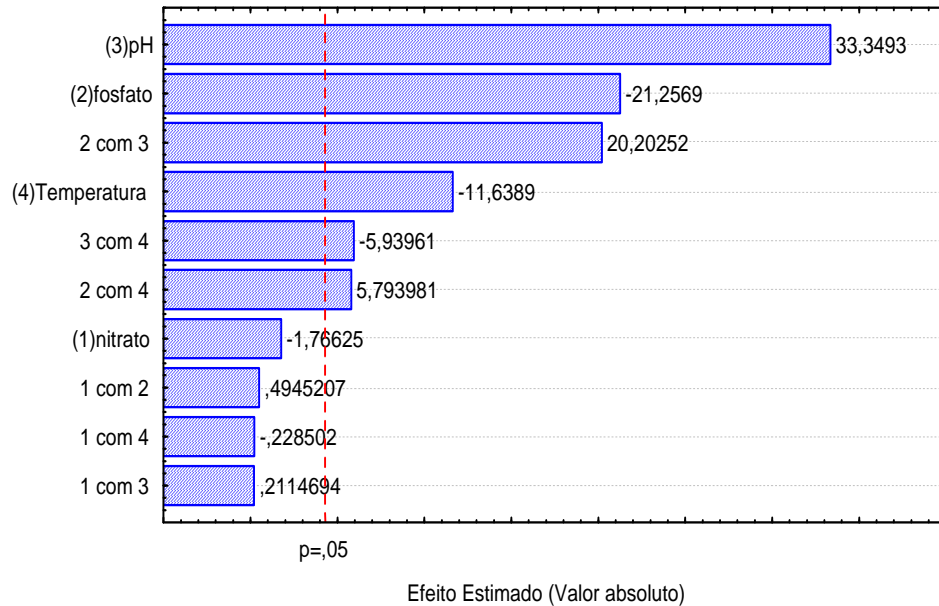


Figura 12 – Diagrama de Pareto para a variável-resposta variação da tensão superficial obtido através do cultivo de *P. aeruginosa* LAMI a 150 rpm durante 96 horas de acordo com um planejamento fatorial $2^4 + 3$.

Dos fatores avaliados, pH, concentração de fosfato e temperatura apresentaram efeitos principais significativos sobre a variável resposta variação da tensão superficial. Os efeitos de interação significativos foram: concentração de fosfato x pH, concentração de fosfato x temperatura e pH x temperatura. A concentração de nitrato não apresentou efeito significativo, dentro do intervalo estudado.

Na Figura 13 está apresentado o Diagrama de Pareto para a produção de biossurfactante (expressa em função da concentração de ramnose).

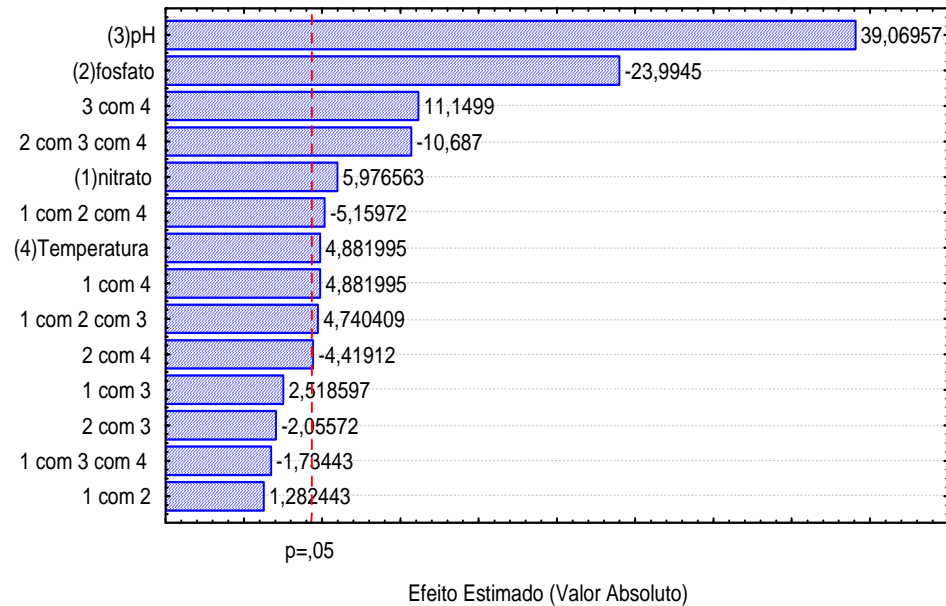


Figura 13 – Diagrama de Pareto para a variável-resposta produção de biossurfactante obtido através do cultivo de *P. aeruginosa* LAMI a 150 rpm durante 96 horas de acordo com um planejamento fatorial $2^4 + 3$.

Todos os fatores apresentaram efeitos principais significativos. Os efeitos de interação pH x temperatura, concentração de nitrato x temperatura, concentração de fosfato x pH x temperatura e concentração de nitrato x concentração de fosfato x temperatura. O pH apresentou efeito positivo, indicando que o pH 7,0 favoreceu a produção de biossurfactante. Este resultado é semelhante a dados de literatura, em que a produção de ramnolipídeo foi ótima neste pH (Santos, 2003). A redução da concentração de fosfato foi favorável para a produção de biossurfactante. Outros autores (Mulligan *et al.*, 1989) mostraram que o aumento da relação C/P através da redução da concentração de fósforo favoreceu a produção do biossurfactante. A Figura 14 mostra o efeito da concentração de fosfato x pH através da análise das médias marginais da concentração de biossurfactante. Verificou-se que houve, para ambos os valores de pH, redução da produção de biossurfactante com o aumento da concentração de fosfato.

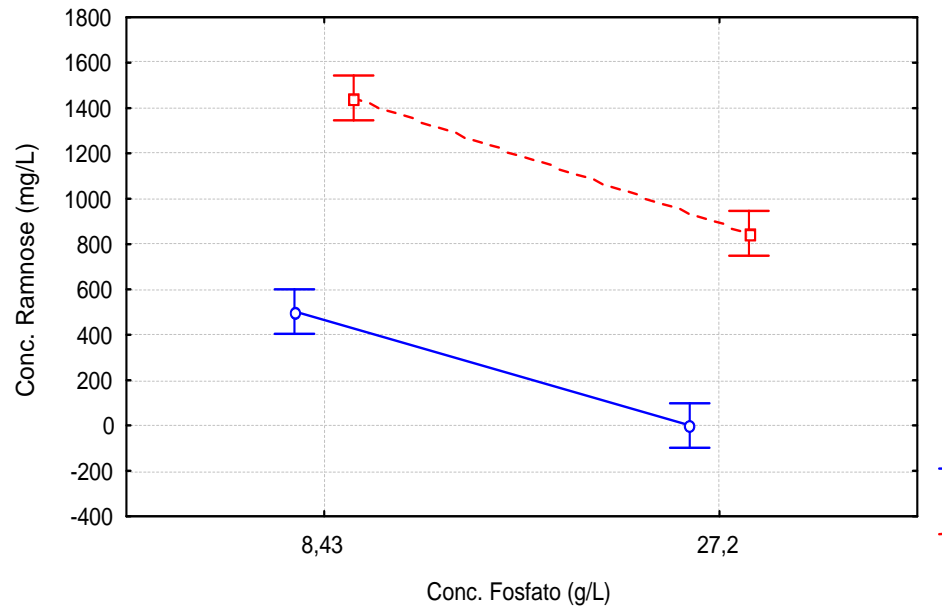


Figura 14 – Médias marginais obtidas para os fatores concentração de fosfato e pH para a variável-resposta produção de biossurfactante a partir de um planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central (pH 4,6 -o-; pH 7,0 - -).

O efeito estimado para a concentração de nitrato mostrou que o aumento da concentração de NaNO_3 , ou seja, redução da razão C/N, favoreceu a produção de biossurfactante, dentro do intervalo estudado. Manresa *et al.* (1991), ao realizarem estudos cinéticos sobre a produção de surfactante por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 utilizando óleo de oliva como substrato, verificaram que a redução da razão C/N aumentou a produtividade de biossurfactante e reduziu a concentração de biomassa. A este fato, atribuiu-se a capacidade desta linhagem em utilizar o nitrato através de respiração anaeróbia em condições limitantes de oxigênio dissolvido. Entretanto, o mecanismo dessa regulação, bem como, o mecanismo pelo qual íons nitrato afetam o crescimento celular e a produção de biossurfactantes não é totalmente conhecido.

II – Ajuste e Análise de um Modelo Matemático

A Tabela 11 apresenta os coeficientes de regressão para o modelo linear proposto para o crescimento celular. Um modelo polinomial também foi proposto para a variável produção de biossurfactante e a Tabela 12 apresenta a análise de regressão.

Tabela 11 – Coeficientes de regressão para o modelo linear proposto para o crescimento celular de *P. aeruginosa* LAMI de acordo com um planejamento fatorial $2^4 + 3$ com triplicata no ponto central.

Fatores	Coeficientes	Desvio Padrão	t(2)	p-valor	-95,%	+95,%
Média/Interc.	7,310908	4,720099	1,54889	0,261517	-12,9980	27,61985
(1)nitrato	-0,963700	1,323155	-0,72834	0,542142	-6,6568	4,72938
(2)fosfato	-0,201374	0,139860	-1,43982	0,286577	-0,8031	0,40040
(3)pH	-0,866748	0,756316	-1,14601	0,370413	-4,1209	2,38742
(4)Temperatura	-0,202297	0,138350	-1,46222	0,281193	-0,7976	0,39297
1 com 2	0,008826	0,029361	0,30060	0,792089	-0,1175	0,13516
1 com 3	0,140068	0,209155	0,66968	0,572022	-0,7599	1,03999
1 com 4	0,032854	0,038660	0,84982	0,484929	-0,1335	0,19919
2 com 3	0,021330	0,018943	1,12604	0,377105	-0,0602	0,10283
2 com 4	0,004225	0,003959	1,06719	0,397644	-0,0128	0,02126
3 com 4	0,027130	0,022123	1,22636	0,344854	-0,0681	0,12232
1 com 2 com 3	0,000974	0,002272	0,42862	0,709952	-0,0088	0,01075
1 com 2 com 4	-0,000418	0,000779	-0,53690	0,645073	-0,0038	0,00293
1 com 3 com 4	-0,004920	0,006092	-0,80760	0,504102	-0,0311	0,02129
2 com 3 com 4	-0,000412	0,000519	-0,79256	0,511113	-0,0026	0,00182

$t_{(2; 0,025)}_{\text{tabelado}} = 4,30$

A avaliação da significância dos coeficientes do modelo pode ser realizada através do teste t e do valor-p para uma probabilidade de 95 %. Observa-se que nenhum dos fatores foi significativo, pois todos apresentaram valor p maior que 0,05. Além disso, os valores do teste t foram inferiores ao valor tabelado, o que indica que os fatores não são significativos. Assim, conclui-se que o modelo proposto para a produção de biomassa não se ajustou bem aos dados experimentais obtidos.

Tabela 12 – Coeficientes de Regressão para o modelo linear proposto para a produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* LAMI de acordo com um planejamento fatorial $2^4 + 3$.

Fatores	Regressão	Desvio Padrão.	t(2)	p	-95,%	+95,%
Média/Interc.	22595,01	2641,184	8,5549	0,013390	11230,91	33959,11
(1)nitrato	-2660,97	740,386	-3,5940	0,069449	-5846,59	524,66
(2)fosfato	-704,45	78,260	-9,0013	0,012118	-1041,18	-367,72
(3)pH	-2848,32	423,205	-6,7304	0,021371	-4669,23	-1027,42
(4)Temperatura	-755,68	77,415	-9,7615	0,010332	-1088,77	-422,59
1 com 2	42,35	16,429	2,5774	0,123302	-28,34	113,03
1 com 3	120,76	117,035	1,0318	0,410594	-382,80	624,32
1 com 4	94,33	21,633	4,3606	0,048775	1,25	187,41
2 com 3	82,66	10,600	7,7984	0,016049	37,05	128,27
2 com 4	23,67	2,215	10,6837	0,008648	14,14	33,20
3 com 4	104,65	12,379	8,4542	0,013704	51,39	157,92
1 com 2 com 3	6,03	1,271	4,7404	0,041735	0,56	11,50
1 com 2 com 4	-2,25	0,436	-5,1597	0,035570	-4,12	-0,37
1 com 3 com 4	-5,91	3,409	-1,7344	0,224978	-20,58	8,76
2 com 3 com 4	-3,11	0,291	-10,6870	0,008642	-4,36	-1,86

$$t_{(2;0,025)}\text{tabelado} = 4,30$$

Dentre os fatores estudados, os efeitos principais da concentração de fosfato, pH e temperatura foram significativos, os efeitos de interação de segunda ordem, concentração de nitrato x temperatura, concentração de fosfato x pH, concentração de fosfato x temperatura e pH x temperatura e os efeitos de interação de terceira ordem concentração de nitrato x concentração de fosfato x pH, concentração de nitrato x concentração de fosfato x temperatura e concentração de fosfato x pH x temperatura, também se mostraram significativos. O valor do coeficiente de correlação foi de 0,7108, com uma percentagem de variação explicada pela regressão de 50,51%. A análise da variância (Tabela 13) mostrou, ainda, que houve falta de ajuste do modelo proposto, visto que o valor $F_{\text{calculado}}$ (Tabela 13) foi maior do que o F_{tabelado} . A Figura 15 mostra a

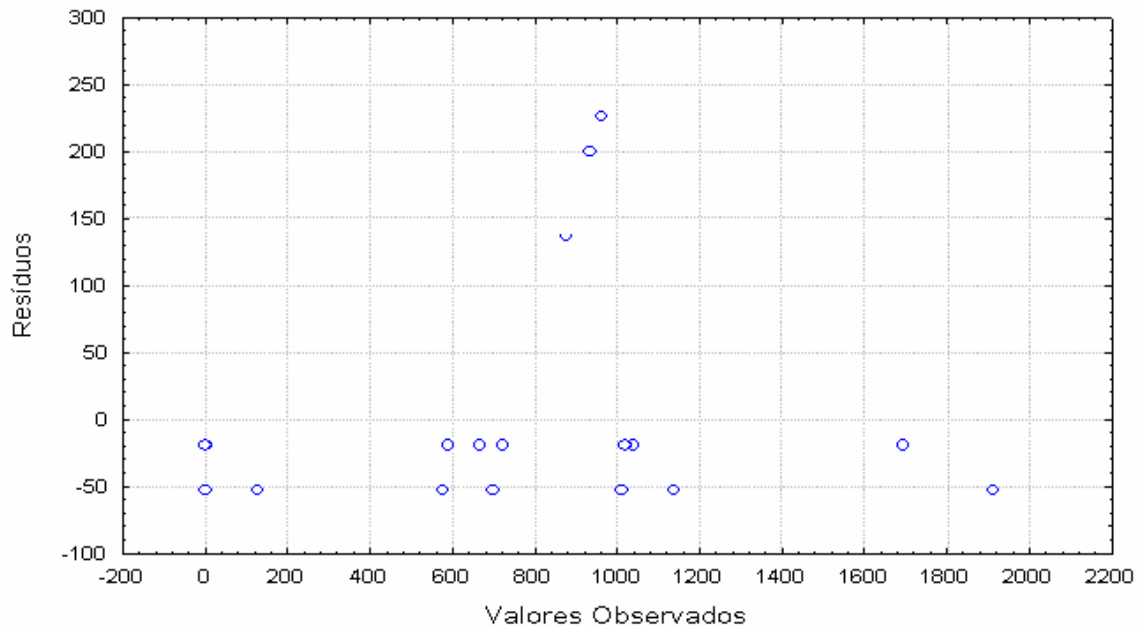


Figura 15 – Distribuição de valores residuais versus valores preditos pelo modelo proposto referente aos efeitos dos fatores concentração de nitrato e de fosfato, pH e temperatura para a produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* LAMI de acordo com um delineamento fatorial completo 2^4 .

Tabela 14 – Coeficientes de regressão para o modelo proposto para a variação da tensão superficial obtido a partir do cultivo de *P. aeruginosa* LAMI de acordo com um planejamento fatorial $2^4 + 3$.

Fatores	Regressão	Desvio Padrão	t(4)	p	-95,%	+95,%
Média.	-144,315	28,93895	-4,9869	0,007560	-224,662	-63,9673
(1)nitrato	2,262	8,11227	0,2788	0,794217	-20,262	24,7850
(2)fosfato	11,423	0,85748	13,3216	0,000184	9,042	13,8039
(3)pH	26,781	4,63698	5,7756	0,004463	13,907	39,6557
(4)Temperatura	4,586	0,84822	5,4064	0,005668	2,231	6,9409
1 com 2	0,183	0,18001	1,0189	0,365863	-0,316	0,6832
1 com 3	-0,934	1,28233	-0,7287	0,506561	-4,495	2,6259
1 com 4	0,020	0,23703	0,0828	0,938026	-0,638	0,6777

2 com 3	-1,749	0,11614	-15,0573	0,000113	-2,071	-1,4263
2 com 4	-0,285	0,02427	-11,7216	0,000303	-0,352	-0,2171
3 com 4	-0,694	0,13563	-5,1191	0,006891	-1,071	-0,3177
1*2*3	0,010	0,01393	0,6972	0,524074	-0,029	0,0484
1*2*4	-0,008	0,00478	-1,6268	0,179107	-0,021	0,0055
1*3*4	0,016	0,03735	0,4316	0,688276	-0,088	0,1198
2*3*4	0,044	0,00318	13,7448	0,000162	0,035	0,0526

$$t_{(4;0,025)} = 2,78$$

Os fatores que se mostraram significativos para a variável-resposta tensão superficial foram concentração de fosfato, pH e temperatura e as interações entre concentração de fosfato x pH, concentração de fosfato x temperatura, pH x temperatura e concentração de fosfato x pH x temperatura (Tabela 13). A Tabela 15 apresenta a análise de variância para o modelo proposto para a tensão superficial.

Tabela 15 – Análise da variância para a variável-resposta tensão superficial obtido a partir do cultivo de *P. aeruginosa* LAMI de acordo com um planejamento fatorial completo $2^4 + 3$.

Fatores	Somas Quadráticas	Médias Quadráticas	F	p
(1)nitrato	0,7225	0,7225	2,8669	0,165669
(2)fosfato	48,9994	48,9994	194,4337	0,000153
(3)pH	113,7778	113,7778	451,4800	0,000029
(4)Temperatura	0,9344	0,9344	3,7080	0,126453
1 com 2	0,3803	0,3803	1,5090	0,286629
1 com 3	0,7225	0,7225	2,8669	0,165669
1 com 4	0,0803	0,0803	0,3185	0,602627
2 com 3	128,4444	128,4444	509,6786	0,000023
2 com 4	53,2900	53,2900	211,4593	0,000130
3 com 4	5,2900	5,2900	20,9912	0,010171
1*2*3	0,1225	0,1225	0,4861	0,524074

1*2*4	0,6669	0,6669	2,6465	0,179107
1*3*4	0,0469	0,0469	0,1863	0,688276
2*3*4	47,6100	47,6100	188,9206	0,000162
Erro	1,0080	0,2520		
Total	402,0960			

A Figura 16 apresenta os valores preditos *versus* valores observados com relação a tensão superficial. O modelo proposto para a tensão superficial é dado pela equação (3).

$$TS = 11,43x_2 + 26,72x_3 + 4,59x_4 - 1,75x_2x_3 - 0,285x_2x_4 - 0,694x_3x_4 + 0,044x_2x_3x_4 - 144,32 \text{ Eq. (3)}$$

A percentagem de variação das medidas em torno da média dada pelo modelo foi de 98,87% com um coeficiente de correlação de 0,9975.

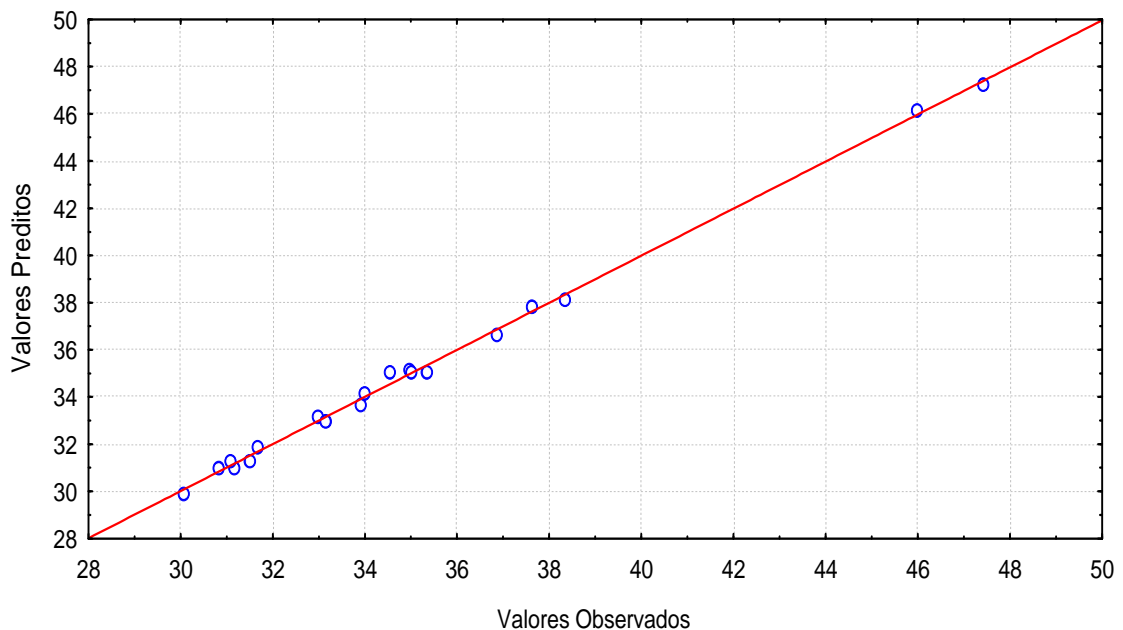


Figura 16 – Valores preditos e observados obtidos a partir de um modelo polinomial proposto para a variável resposta tensão superficial de acordo com planejamento fatorial completo $2^4 + 3$.

A Figura 17 mostra o comportamento da tensão superficial em função da temperatura e do pH para concentrações de KH_2PO_4 de 8,43 g/L e NaNO_3 de 4 g/L de acordo com a equação

3. Pode-se observar que para uma temperatura de 37 °C e pH 7,0 a tensão superficial atingiu valores de até 34 mN/m. Este valor não representou a tensão superficial mínima obtida a partir do planejamento (30 mN/m), entretanto verificou-se a partir dos coeficientes de rendimento e produtividade volumétrica obtidos, que esta condição favoreceu a produção de biossurfactante (ver Tabela 9, ensaio 14). Portanto, assumiu-se como melhor condição àquela em que se obteve a maior produção de biossurfactante, sendo que a avaliação das propriedades tensoativas do biossurfactante produzido sob este condição será avaliada através da determinação do índice de emulsificação e da atividade emulsificante.

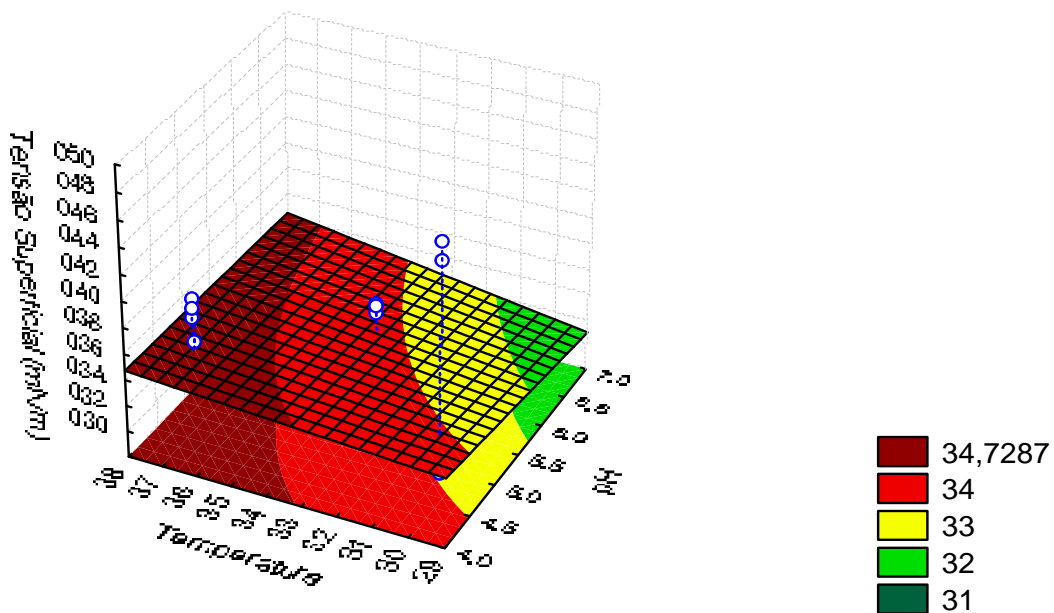


Figura 17 – Superfície de resposta obtida a partir da equação 3 para a variável-resposta tensão superficial com fatores fixos de $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 8,43 \text{ g/L}$ e $\text{NaNO}_3 = 4,0 \text{ g/L}$.

4.3 – Efeito de diferentes fontes de nitrogênio sobre o crescimento celular e a produção do biossurfactante

Foram avaliadas três fontes de nitrogênio sobre o crescimento e produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* LAMI. A Tabela 16 apresenta a produção de biomassa e de ramnolipídeos de acordo com a fonte de nitrogênio.

Tabela 16 – Produção de biomassa, de ramnolipídeo e pH final obtidos a partir do cultivo de *P. aeruginosa* LAMI durante 96 horas sob agitação de 150 rpm a 30 °C em meio contendo 2,4 g/L da fonte de nitrogênio, 3,0 g/L de KH_2PO_4 , 7,0 g/L de K_2HPO_4 , 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 % (v/v) de glicerina e pH 7,0.

Fonte de nitrogênio	Biomassa (g/L)	Ramnolipídeo (mg/L)	pH final
NaNO_3	0,693	1338,32 ± 29,81	7,72
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,780	1138,22 ± 26,69	5,77
Peptona	0,626	1020,96 ± 9,80	6,98

Todas as fontes de nitrogênio suportaram o crescimento celular, obtendo-se melhor produção de biomassa com o sulfato de amônio (Tabela 16). Pode-se observar que o pH final variou de acordo com a fonte de nitrogênio utilizada. A produção de biossurfactante com nitrato de sódio foi maior comparativamente às demais fontes. A preferência por nitrato de sódio para a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas* é bastante estudada na literatura (Manresa *et al.*, 1991, Mulligan e Gibbs, 1989, Chayabutra *et al.*, 2001), sendo a sua maior eficiência atribuída à possibilidade de assimilar o nitrato através de rota denitrificante sob condições limitantes de oxigênio (Hernandez e Rowe, 1987).

4.4 – Estudo da Cinética de Crescimento Celular, Produção de Biossurfactante e Consumo de Glicerol por *P. aeruginosa* LAMI.

O perfil da cinética de crescimento celular, produção de biossurfactante e consumo de glicerol para o ensaio 14 (Tabela 9) está apresentado na Figura 18. A Tabela 17 mostra os coeficientes de rendimento para o ensaio 14 ao longo de 96 horas de cultivo.

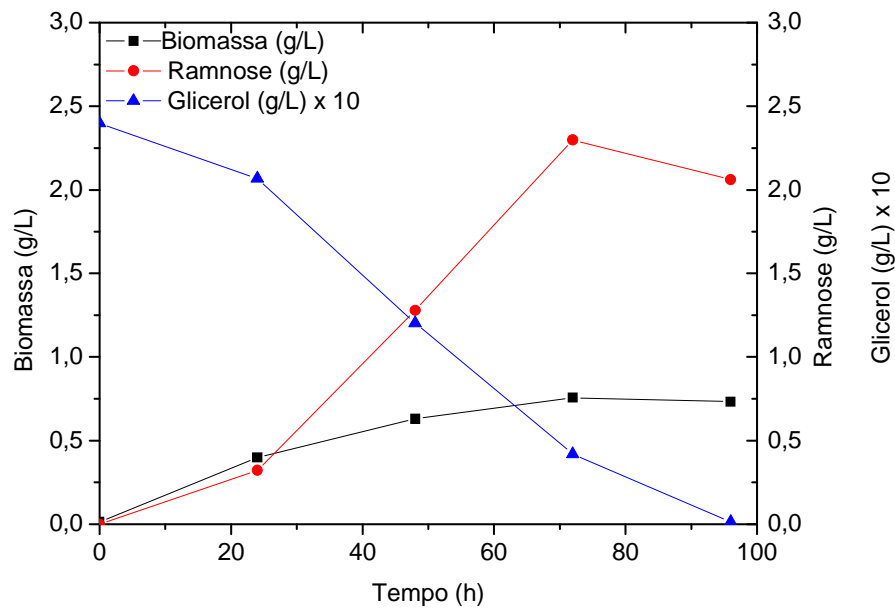


Figura 18 – Cinéticas de crescimento celular, produção de biossurfactante e consumo de glicerol para *P. aeruginosa* LAMI de acordo com o ensaio 14 ($[\text{NaNO}_3] = 4,0 \text{ g/L}$, $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 8,43 \text{ g/L}$, pH 7,0 e $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$).

Tabela 17 – Coeficientes de rendimento obtidos para *P. aeruginosa* LAMI obtidos a partir da cinética de crescimento celular e produção de biossurfactantes de acordo com o ensaio 14 ($[\text{NaNO}_3] = 4,0 \text{ g/L}$, $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 8,43 \text{ g/L}$, pH 7,0 e $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$).

Tempo (h)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{P/X}$ (g/g)	Q_P (mg/Lh)
0	0	0	0
24	0,098	0,810	13,44
48	0,107	2,031	26,65
72	0,116	3,040	31,94
96	0,086	2,811	21,46

Observou-se que a produção de ramnolípídeo iniciou durante a fase exponencial de crescimento (24 horas) (Figura 18). A fase estacionária iniciou em 72 horas, onde se atingiu um máximo de concentração de ramnose (2,3 g/L). Houve consumo total de glicerol com 96 horas de crescimento.

Observou-se que os coeficientes de rendimento e a produtividade volumétrica foram máximos ($Y_{P/X} = 3,040$ g/g, $Y_{P/S} = 0,116$ g/g e $Q_P = 31,94$ mg/Lh) com 72 horas de cultivo, ocorrendo uma redução com 96 horas de cultivo (Tabela 17), o que pode ser atribuído à escassez de substrato no meio e consumo do biossurfactante como substrato (Figura 18). Santa Anna *et al.* (2005) obtiveram, com *P. aeruginosa* PA1 cultivada em meio sintético contendo glicerol como fonte de carbono, um valor de $Y_{P/S}$ máximo em torno de 0,13 g/g com uma razão C/N equivalente a 60. Manresa *et al.* (1991), ao cultivar *P. aeruginosa* 44T1 em meio contendo óleo de oliva como substrato obteve produção máxima de rhamnolipídeo de 10 g/L e $Y_{P/X}$ de 2,38 g/g. Verificou-se, portanto, que os rendimentos obtidos foram próximos a dados da literatura, indicando que a condição utilizada foi adequada para a produção de biossurfactante por *P. aeruginosa* LAMI. A Figura 19 mostra a cinética realizada com glicerol PA sob as mesmas condições de cultivo que o ensaio 14 ($[\text{NaNO}_3] = 4,0$ g/L, $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 8,43$ g/L, pH 7,0 e $T = 37$ °C) e $[\text{glicerol}] = 23,9$ g/L).

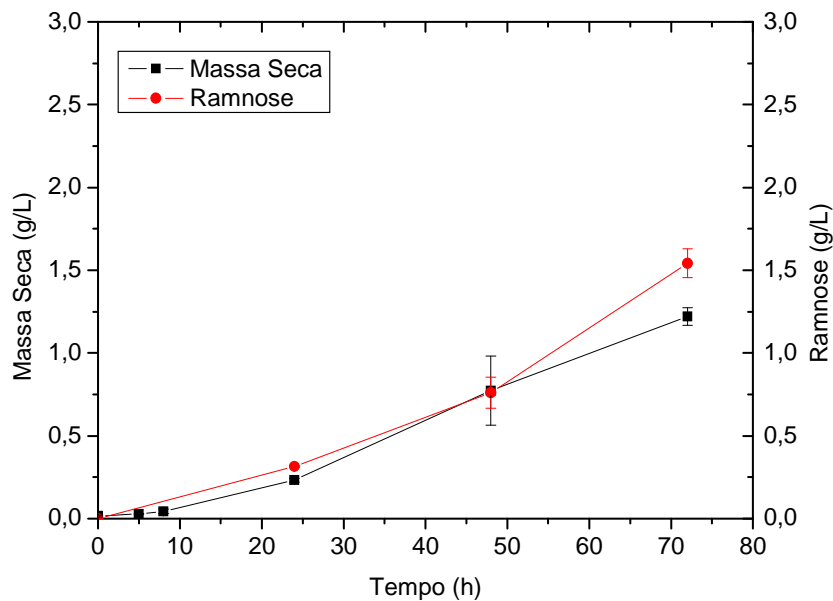


Figura 19 – Cinética de crescimento celular e produção de biossurfactante para *Pseudomonas sp* LAMI com glicerol PA sob as condições de cultivo do ensaio 14 ($[\text{NaNO}_3] = 4,0$ g/L, $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 8,43$ g/L, pH 7,0, $T = 37$ °C e $[\text{glicerol}] = 23,9$ g/L).

Observou-se que a produção de biossurfactante com glicerol PA foi menor (1,54 g/L) do que a obtida com a glicerina oriunda da produção do biodiesel (2,3 g/L). A este fato pode-se considerar que a ausência de micronutrientes, como Fe, Zn e Ca, que são constituintes da glicerina (Tabela 5), interferiram na produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* LAMI (Figura 19). A curva de crescimento mostrou a presença de uma fase lag até 8 horas de cultivo para o glicerol PA (Figura 20). A isto atribuiu-se a necessidade das células em se adaptarem a condição de reduzidas concentrações de micronutrientes. Entretanto, a linhagem foi capaz de crescer e produzir glicolipídeos no meio formulado.

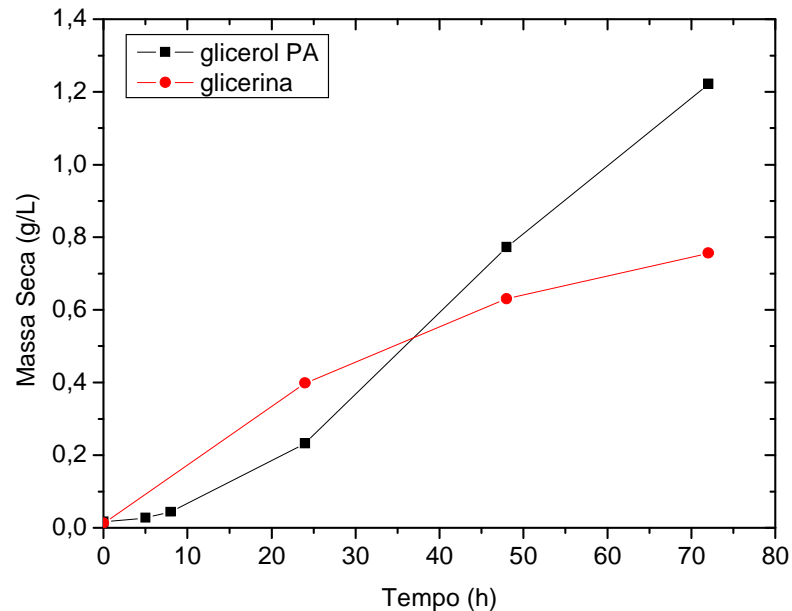


Figura 20 – Cinéticas de crescimento celular para *P. aeruginosa* LAMI com glicerol PA e glicerina sob as condições de cultivo do ensaio 14 ($[\text{NaNO}_3] = 4,0 \text{ g/L}$, $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 8,43 \text{ g/L}$, pH 7,0, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ e $[\text{glicerol}] = 23,9 \text{ g/L}$).

Avaliaram-se diferentes razões entre carbono e nitrogênio (C/N) sobre o crescimento celular, produção de biossurfactante e consumo de glicerol. A Figura 21 mostra o comportamento do crescimento celular com relação a diferentes razões C/N.

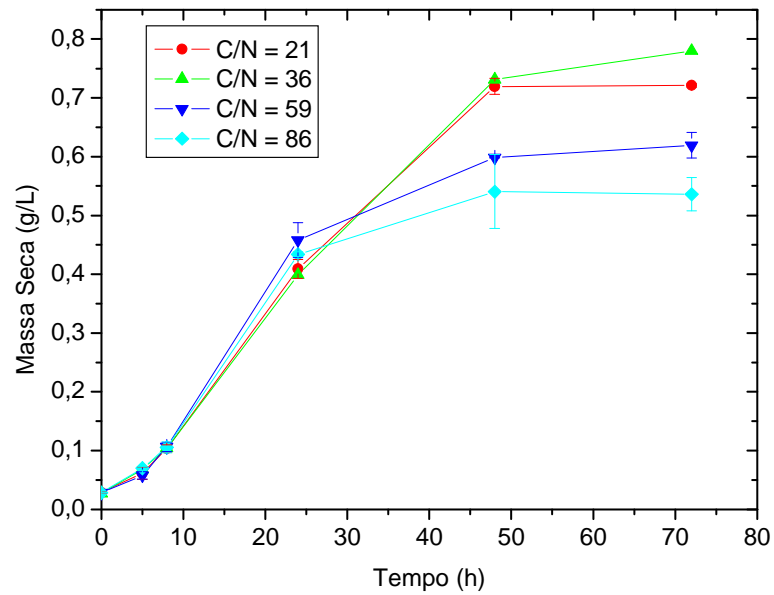


Figura 21 - Comportamento do crescimento celular com relação à razão C/N em cultivo submerso de *P. aeruginosa* LAMI a 150 rpm e 37 °C.

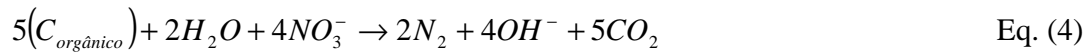
Pode-se observar que o crescimento celular foi menor para as razões C/N 86 e 59. A produção de biomassa para as demais razões C/N foram pouco influenciadas pela variação da concentração de nitrato (2,4 e 4,0 g/L) (Tabela 18).

Tabela 18 - Produções de biomassa a partir do cultivo a 150 rpm e 37 °C de *P. aeruginosa* LAMI em meio formulado com glicerina como fonte de carbono e NaNO₃ como fonte de nitrogênio utilizando razões C/N de 86, 59, 36 e 21.

Razão C/N	Biomassa (g/L)
21	0,722 ± 0,0035
36	0,78 ± 0,031
59	0,620 ± 0,022
86	0,536 ± 0,028

Manresa *et al.* (1991), ao cultivar *P. aeruginosa* 44T1 em meio contendo óleo de oliva como substrato observaram que a redução da razão C/N favoreceu a produção de ramnolipídeos, obtendo uma razão C/N ótima equivalente a quatro. Uma hipótese para explicar este efeito é a

possível redução de nitrato por respiração anaeróbia sob limitação de oxigênio por linhagens bacterianas denitrificantes (Hernandez e Rowe, 1987). A equação (4) representa o processo de denitrificação (Barber e Stuckey, 2000).



Pode-se verificar que a denitrificação altera o pH do meio, através da liberação de íons hidroxila, que é proporcional às concentrações de carbono e de nitrato iniciais, sendo este fato verificado por Barber e Stuckey (2000) em um processo de remoção de nitrogênio para tratamento de efluentes sob condições anóxicas. O comportamento do pH durante o cultivo (Figura 22) sugeriu que o microrganismo utilizou a rota de denitrificação para assimilação de nitrato. A Figura 22 mostra que o pH aumentou durante a fase exponencial em todos os ensaios. Na fase estacionária, o pH diminuiu para os ensaios com menor concentração de nitrato (1,0, 1,45 e 2,4 g/L) e, para os ensaios em que se utilizou 4,0 g/L de NaNO₃, o pH manteve-se constante. Além disso, o ensaio com maior concentração de glicerol (C/N = 21) apresentou pH final maior do que aquele cuja concentração de glicerol foi menor (C/N = 12 e concentração de glicerol de 24 g/L) (Figura 23).

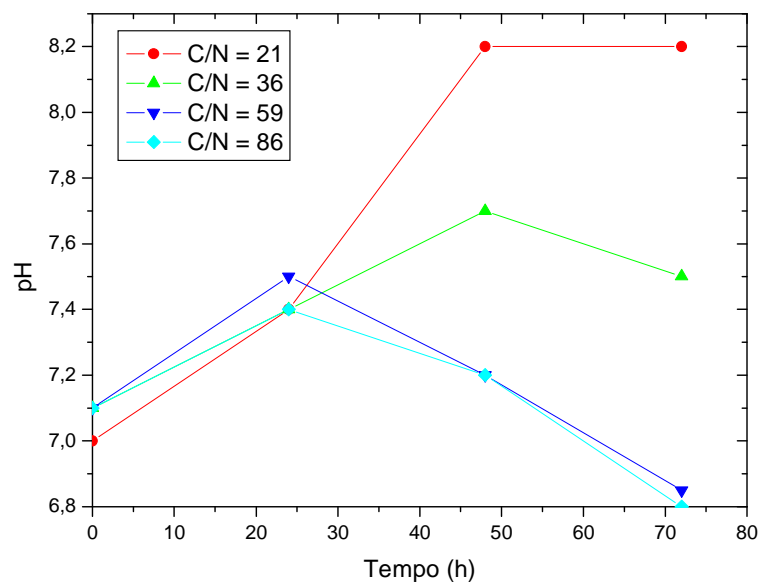


Figura 22 - Comportamento do pH de um cultivo de *P. aeruginosa* LAMI durante 72 horas a 150 rpm e 37 °C em meio de cultivo contendo glicerol como fonte de carbono e NaNO₃ como fonte de nitrogênio e sob diferentes razões C/N.

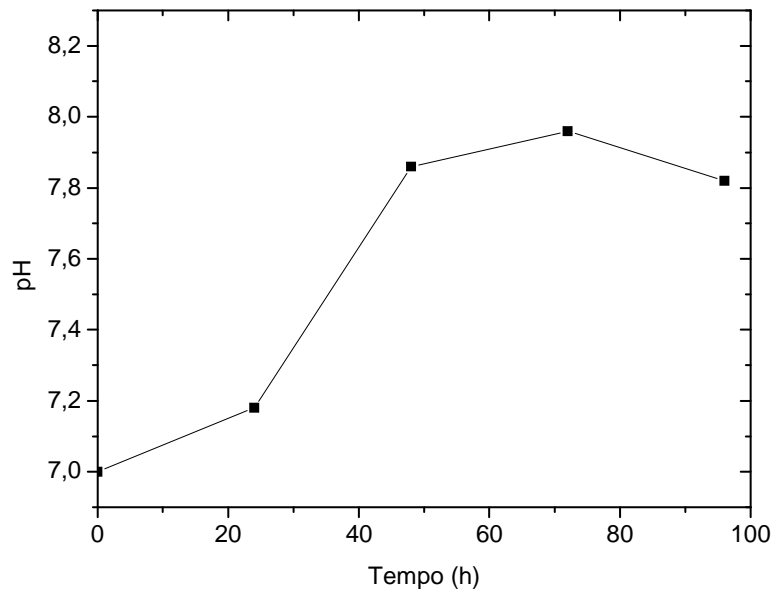


Figura 23 – Comportamento do pH de um cultivo de *P. aeruginosa* LAMI durante 96 horas sob agitação de 150 rpm e 37 °C em meio de cultivo contendo glicerol como fonte de carbono e NaNO₃ como fonte de nitrogênio para uma razão C/N = 12.

Entretanto, a assimilação de nitrogênio a partir do nitrato, pode ser realizada também através da redução a amônia (Mulligan *et al.*, 1989). Este processo ocorre em duas etapas que estão representadas pelas equações 5 e 6 (Barber e Stuckey, 2000).



Pode-se verificar que ambos os processos de assimilação de nitrogênio podem alterar o pH do meio de cultivo. Portanto, o mecanismo de assimilação de nitrato não é totalmente evidente.

Além da concentração de nitrogênio, a concentração inicial de glicerol também exerceu influência sobre o crescimento celular, sendo que a fase estacionária se iniciou com 72 horas de crescimento para o ensaio realizado com concentração inicial de glicerol de 24 g/L (Figura 19), enquanto que para os ensaios em que se utilizou uma concentração de glicerol maior (42 g/L) a fase estacionária de crescimento foi atingida com 48 horas de cultivo.

O consumo de glicerol está apresentado na Figura 24. Observou-se que os perfis de consumo de glicerol foram semelhantes para todas as razões C/N avaliadas. O consumo de glicerol também não foi afetado pela variação da concentração de nitrogênio.

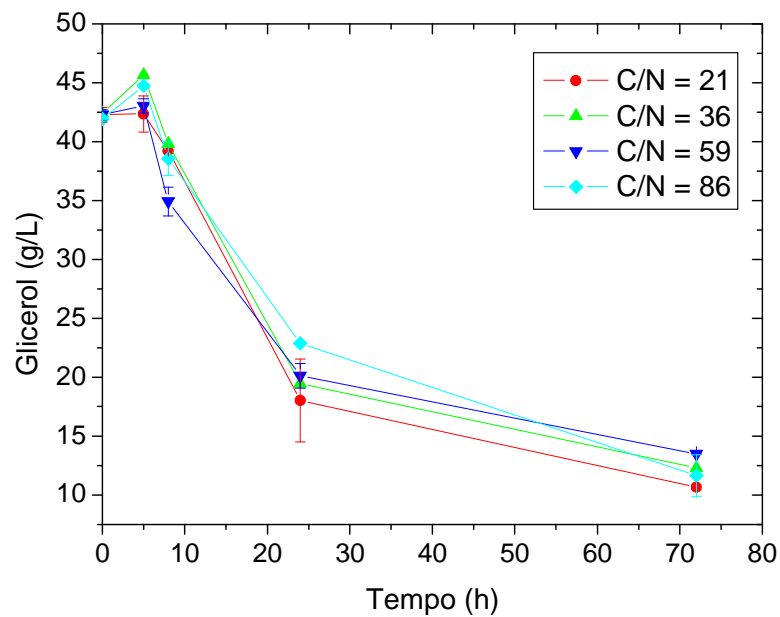


Figura 24 - Perfil do consumo de glicerol a partir do cultivo submerso de *P. aeruginosa* LAMI a 150 rpm e 37 °C com glicerol como fonte de carbono e NaNO₃ como fonte de nitrogênio para diferentes razões C/N.

Os resultados previamente obtidos mostraram que a redução da razão C/N favoreceu a produção de biotensoativos. As Figuras 25 a 29, mostram o perfil do crescimento celular e da produção de biossurfactantes com relação a razão C/N.

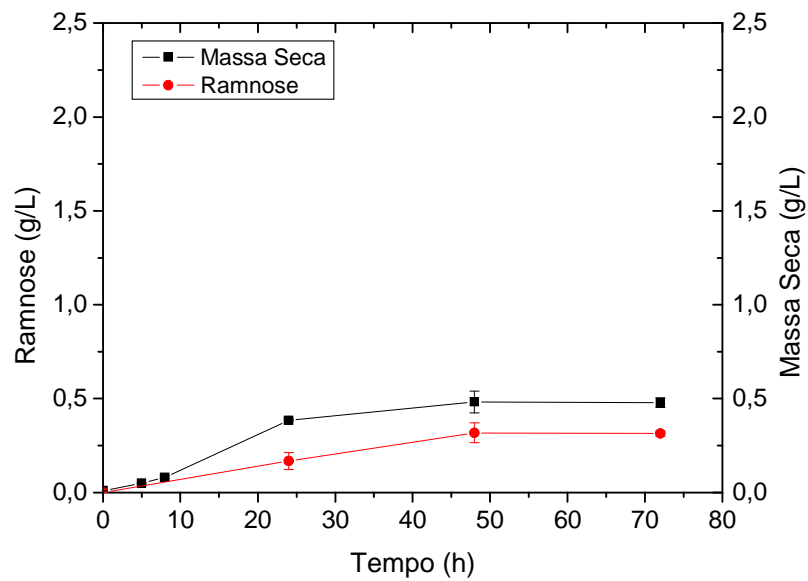


Figura 25 - Cinética de crescimento celular e produção de biomassa a partir de um cultivo de *P. aeruginosa* LAMI a 150 rpm e 37°C para uma razão C/N = 86.

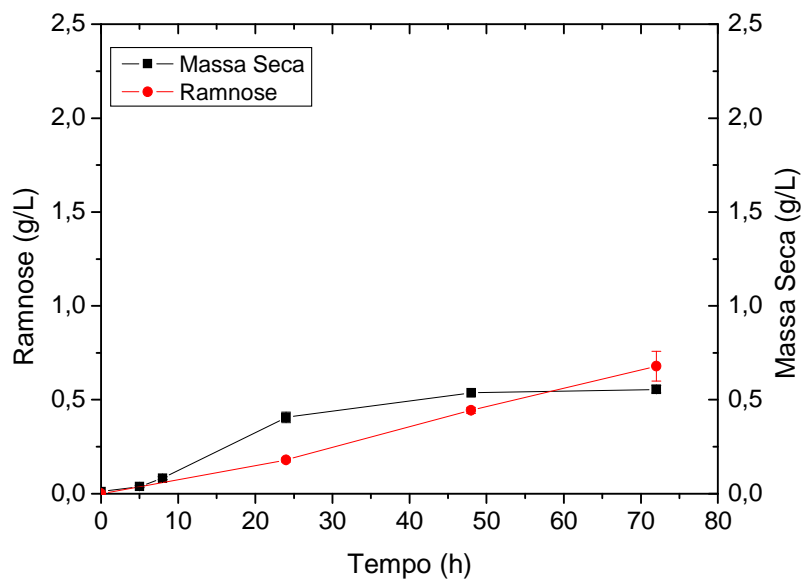


Figura 26 - Cinética de crescimento celular e produção de biomassa a partir de um cultivo de *P. aeruginosa* LAMI a 150 rpm e 37°C para uma razão C/N = 59.

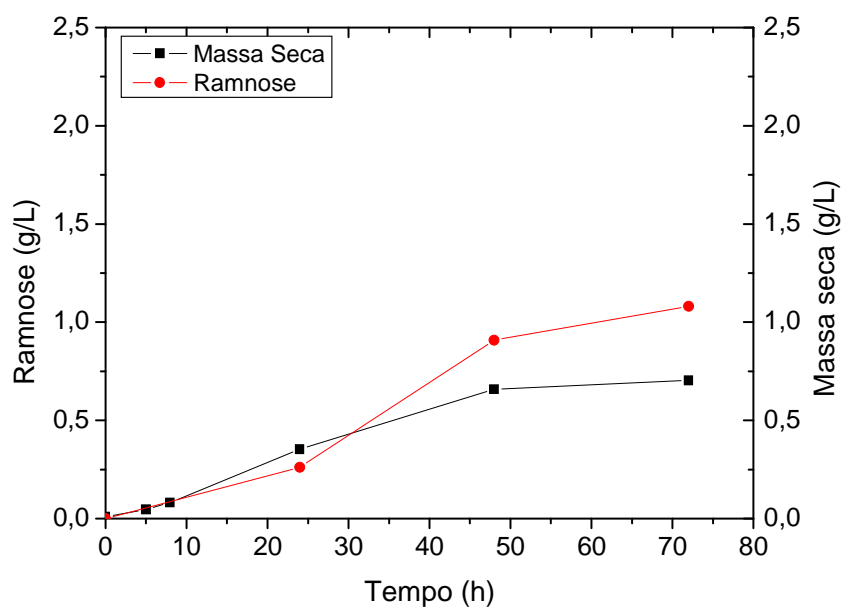


Figura 27 - Cinética de crescimento celular e produção de biomassa a partir de um cultivo de *P. aeruginosa* LAMI a 150 rpm e 37°C para uma razão C/N = 36.

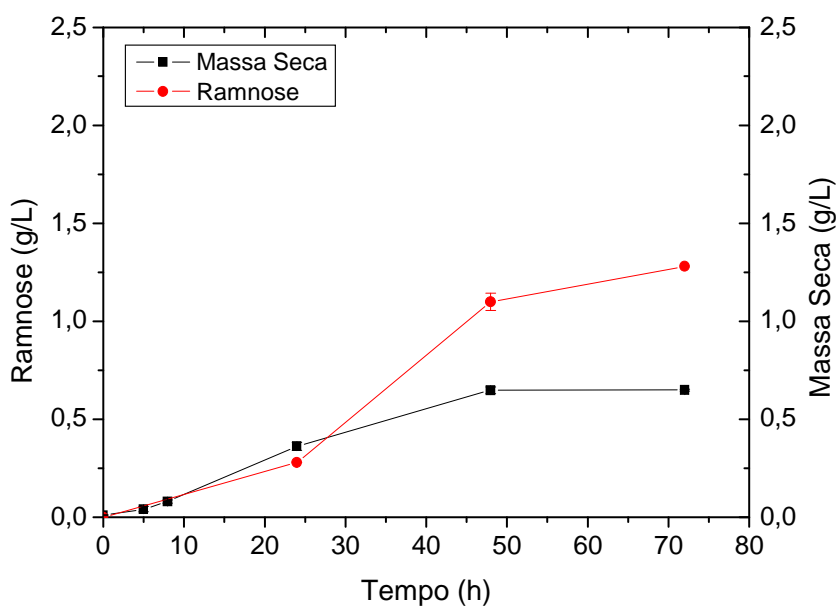


Figura 28 - Cinética de crescimento celular e produção de biomassa a partir de um cultivo de *P. aeruginosa* LAMI a 150 rpm e 37°C para uma razão C/N = 21.

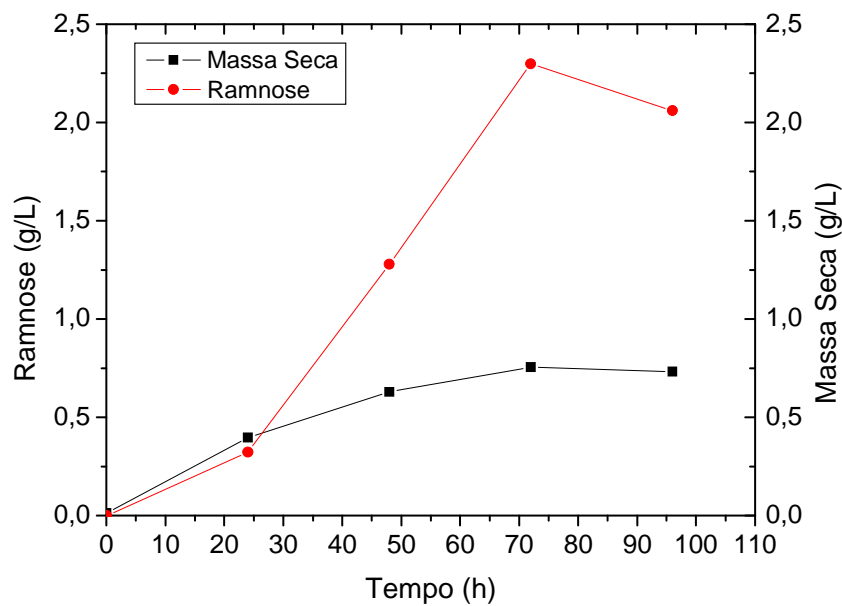


Figura 29 - Cinética de crescimento celular e produção de biomassa a partir de um cultivo de *P. aeruginosa* LAMI a 150 rpm e 37 °C para uma razão C/N = 12.

O acompanhamento cinético do crescimento celular e da síntese de biossurfactante mostrou que houve produção de biossurfactante a partir de 24 horas de cultivo para todas as condições, ou seja, a produção deste bioproduto se iniciou antes da fase estacionária de crescimento. Desta forma, sugere-se que a síntese de biossurfactante seguiu uma cinética mista, semi-associada ao crescimento. Santos *et al.* (2003) verificaram comportamento semelhante ao cultivar *P. aeruginosa* PA1 em meio sintético com glicerol como fonte de carbono e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio em biorreator de bancada.

4.5 – Avaliação do biossurfactante produzido quanto a capacidade de emulsificar hidrocarbonetos

A Figura 30 mostra o comportamento do índice de emulsificação frente a querosene utilizando meio de cultivo livre de células de todos os ensaios realizados.

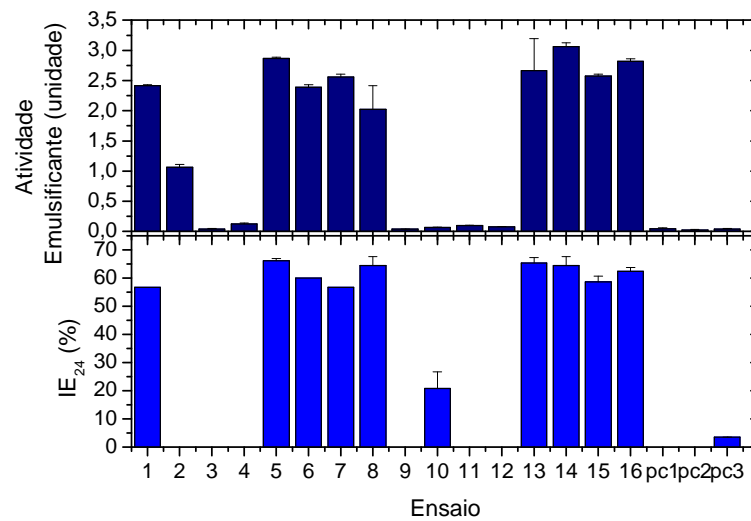


Figura 30 – Valores de índice de emulsificação e atividade emulsificante com querosene comercial com meio de cultivo livre de células de *P. aeruginosa* LAMI para os ensaios realizados de acordo com planejamento fatorial $2^4 + 3$.

O índice de emulsificação determina a capacidade do bioemulsificante em formar emulsões. Os resultados mostraram grande variação entre os ensaios. Isso pode ser observado através dos ensaios 2, 3, 4, 9, 11, 12 e os pontos centrais que não apresentaram valores mensuráveis de índice de emulsificação. Para os demais ensaios, o índice de emulsificação variou de 55 % a 65 %, em média, com exceção apenas do ensaio 10, que apresentou valor de IE₂₄ de 20,83%. Costa *et al.* (2006) obtiveram índice de emulsificação com querosene de, aproximadamente, 70 %, para produção de ramnolipídeos a partir de óleo de andiroba, e de 65 % para biossurfactante obtido a partir de óleo de buriti, utilizando *P. aeruginosa* LBI.

O efeito dos fatores estudados também foi verificado sobre a atividade emulsificante, que determina a capacidade do biossurfactante produzido em formar emulsões óleo-água. Neste método, a turbidez promovida pela dispersão da fase óleo na fase aquosa é determinada através da medida da absorvância a 540 nm. Verificou-se que houve relação entre a atividade emulsificante e índice de emulsificação (Figura 30), ou seja, aqueles ensaios em que houve formação de emulsão apresentaram elevada atividade emulsificante, com um valor máximo de 3 unidades (ensaio 14), verificando-se que o biossurfactante produzido a partir deste ensaio possui boas características emulsificantes. O Ensaio 2, entretanto, apresentou atividade emulsificante de

1,06 unidades sem apresentar índice de emulsificação. Amaral *et al.* (2006) obtiveram valor máximo de atividade emulsificante de, aproximadamente, 2 unidades com n-hexadecano em meio YPD após 50 horas de cultivo de *Yarrowia lipolytica* a 250 rpm. Liposan, um bioemulsificante obtido por *Candida lipolytica*, apresentou atividade emulsificante com n-hexadecano de 0,98 unidade quando cultivada em meio YNB suplementado com 5 % de óleo de soja (Cirigliano e Carman, 1985). Assim, observa-se que o biossurfactante obtido mostrou boa afinidade para a formação de emulsões com querosene.

Além do querosene, o biossurfactante obtido a partir do ensaio 14 ($[\text{NaNO}_3] = 4,0$ g/L, $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 8,43$ g/L, pH 7,0 e $T = 37$ °C), apresentou boa ação emulsificante para emulsões formadas com substratos de origem vegetal (óleo de soja e éster metílico), bem como com óleo naftênico (NH20) de origem mineral. A Figura 31 mostra que o índice de emulsificação foi de, aproximadamente, 65 % para todos os substratos avaliados, com exceção do óleo de mamona.

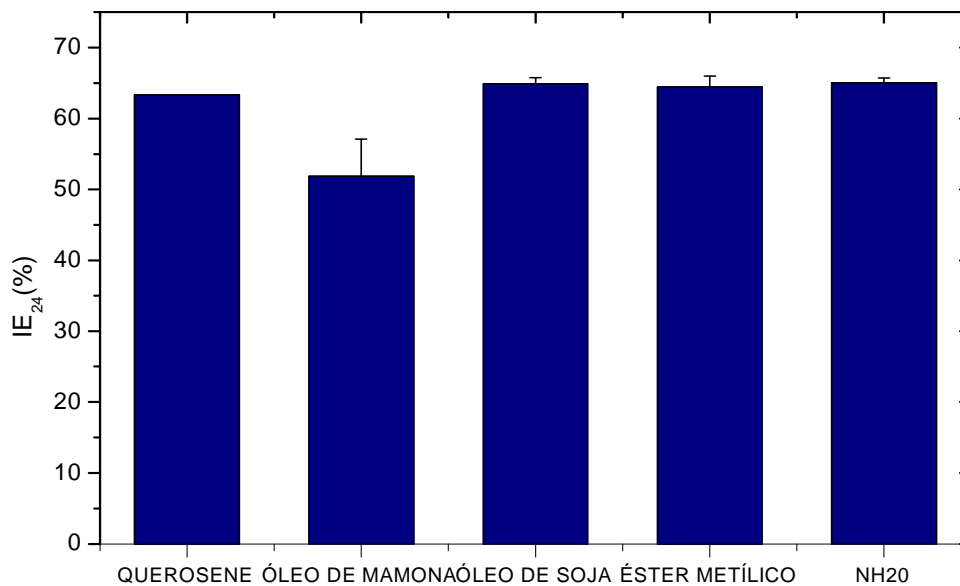


Figura 31 – Índice de emulsificação com diferentes substratos hidrofóbicos realizados em meio de cultura livre de células obtido de acordo com o ensaio 14 ($[\text{NaNO}_3] = 4,0$ g/L, $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 8,43$ g/L, pH 7,0 e $T = 37$ °C).

4.6 – Purificação dos Biossurfactantes obtidos por Cromatografia em Coluna e Cromatografia em Camada Delgada.

Os extratos obtidos por extração líquido-líquido foram submetidos a separação cromatográfica com sílica gel 60 como adsorvente. As frações obtidas a partir da coluna foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) que revelou a obtenção de dois compostos majoritários. A Figura 32 apresenta os *spots* dessas frações em CCD, revelando duas zonas distintas relativas aos produtos obtidos. O produto 2 foi submetido à análise por ressonância magnética nuclear H^1 (RMN- H^1 , 300MHz, CD_3OD). O Produto 1 purificado foi obtido em quantidade muito pequena impossibilitando a obtenção de um espectro de RMN- H^1 .



A B C

Figura 32 – Cromatografia em camada delgada dos ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* LAMI com glicerol como substrato e cultivo de 72 horas a 37 °C sob agitação de 150 rpm. A – Produto 1; B – Mistura 1 + 2; C – Produto 2.

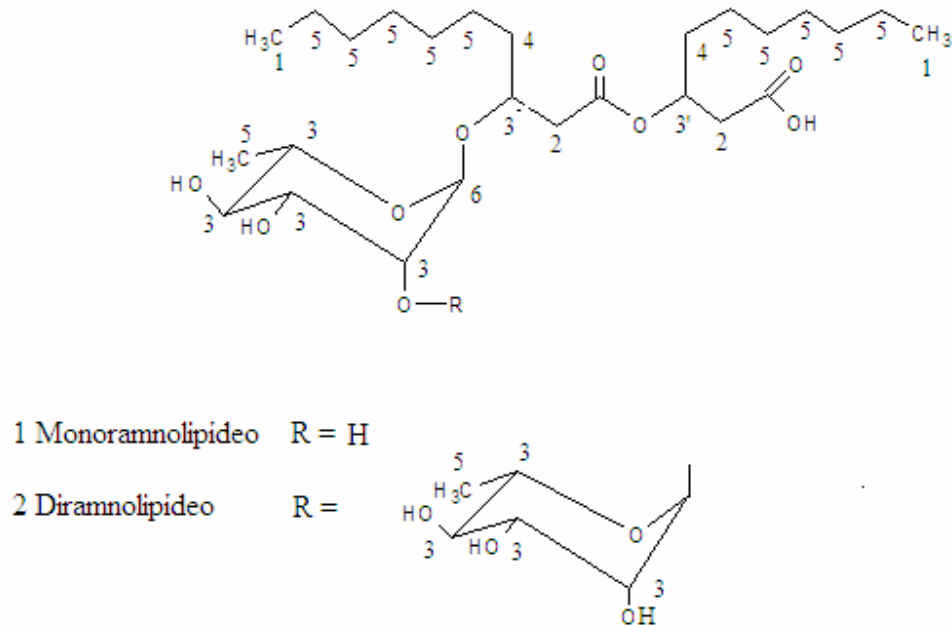


Figura 33 – Estruturas de mono (RhaC₁₀C₁₀) e diramnosilipídeos (Rha-RhaC₁₀C₁₀) (Sharma, *et al.* 2007).

Os deslocamentos químicos foram semelhantes aos obtidos por um espectro de RMN H^1 de ramnosilipídeos produzidos por *Pseudomonas* sp GRP₃ cujas estruturas estão apresentadas na Figura 33 (Sharma *et al.*, 2007). Desta forma, analisando-se o espectro de RMN- H^1 (Anexo D) verificou-se que ocorreu um tripleto em δ_H 0,95 com integração para 6 hidrogênios, correspondendo a presença de duas metilas terminais da cadeia alifática (número 1 Figura 33). Os hidrogênios referentes ao grupamento CH_2 (número 2 Figura 33) na cadeia carbônica que possui uma ligação éster formaram um multipeto em δ_H 2,55, com integração referente a 4 hidrogênios, correspondendo a presença de dois grupamentos. Já os hidrogênios dos grupamentos CH_2 que iniciam a cadeia alifática (número 4 Figura 33) apresentaram δ_H 1,65 e também apresentaram integração de, aproximadamente, 4 hidrogênios correspondendo a dois grupos. A diferença de deslocamentos químicos entre os grupos CH_2 deve-se a presença dos átomos de oxigênio das ligações éster e carbonila que tornam os hidrogênios ligados aos átomos de carbono próximos a estes grupos oxigenados mais desprotegidos. Os hidrogênios ligados a átomos de carbono oxigenados, tipo H-CO, apresentaram deslocamentos químicos em uma faixa de 3,3 a 4,15, correspondendo aos hidrogênios da molécula de ramnose, bem como, aos prótons ligados aos

átomos de carbono ligados aos grupos éster e carbonila. A integração sugere a presença de duas unidades de ramnose (Figura 33). Entretanto, o hidrogênio ligado ao carbono localizado na posição 3' (Figura 33) apresenta δ_H 5,29 sob a forma de um penteto, cuja integração equivalente a 1 indica a presença de um único grupamento deste tipo. Os átomos de hidrogênio ligados a cadeia alifática (número 5 Figura 33), bem como, ao grupo metila da unidade de ramnose, apresentaram δ_H 1,30 na forma de multipletos. A integração indicou que as cadeias carbônicas laterais possuem, provavelmente, 10 átomos de carbonos. A presença de hidrogênios com δ_H 4,96 confirma a presença de átomos de carbono anomérico (número 6 Figura 33). Entretanto, o deslocamento referente ao hidrogênio da molécula de água ficou superposto ao sinal daquele hidrogênio, impossibilitando a quantificação destes através da integração do pico. Assim, observou-se que o espectro de RMN- H^1 forneceu uma elucidação parcial da estrutura, que apresenta características de uma molécula de diramnolípídeo (ácido 2-O- α -L-ramnopiranosil- α -L-ramnopiranosil- α -hidroxidecanoil- α -hidroxidecanóico). A caracterização estrutural completa pode ser obtida através da análise conjunta de espectros de infravermelho e RMN- C^{13} .

5 – CONCLUSÕES

A produção de ramnolipídeos foi favorecida através da utilização do nitrato de sódio como fonte de nitrogênio e a avaliação das condições de cultivo sobre *P. aeruginosa* LAMI mostrou que reduzida razão C/N, concentração de fosfato de 8,43 g/L, concentração de nitrato de 4,0 g/L, temperatura de 37 °C e pH 7,0 apresentaram produtividade máxima de 31,94 mg/Lh de ramnolipídeo, $Y_{P/X} = 3,04$ g/g e $Y_{P/S} = 0,116$ g/g com 72 horas de cultivo. A maior produção de biossurfactantes com a redução da razão C/N sugeriu um possível rota de desnitrificação para a assimilação do nitrato.

O emprego do planejamento experimental como ferramenta mostrou-se eficiente quanto à análise de efeitos sobre as variáveis-resposta (produção de biomassa, produção de biossurfactante e tensão superficial), entretanto, não foi possível a otimização da tensão superficial, bem como, a obtenção de um modelo matemático para a produção de biossurfactantes, pois o modelo proposto não se ajustou aos dados experimentais, sendo possível que ele seja muito simples para descrever o fenômeno aqui estudado.

As propriedades tensoativas do biossurfactante, atividade emulsificante e índice de emulsificação foram função das condições nutricionais e ambientais, obtendo-se maior índice de emulsificação (IE_{24}) equivalente a 70 % e atividade emulsificante de 3,25 unidades. Além disso, o biossurfactante foi capaz de formar emulsões com IE_{24} de, aproximadamente, 60 % com óleo de soja, éster metílico, óleo naftênico (NH20). Estes resultados mostraram que o biossurfactante produzido apresentou boas características emulsificantes para emulsificar hidrocarbonetos de origem mineral e óleo vegetais.

A sílica gel 60 mostrou-se um adsorvente adequado para o isolamento e purificação dos ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* LAMI. O espectro de RMN H^1 do composto de maior polaridade mostrou que a estrutura do ramnolipídeo foi semelhante a estrutura de um diramnolipídeo Rha-Rha- $C_{10}C_{10}$. Entretanto, o espectro de RMN H^1 constituiu apenas uma etapa preliminar da caracterização da estrutura dos ramnolipídeos.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, a glicerina resultante do processo de transesterificação do óleo de mamona, cuja composição contém micronutrientes, tais como, ferro,

zinc, cálcio, magnésio e enxofre, é uma fonte de carbono e de nutrientes adequada para o crescimento e produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* LAMI.

6 – TRABALHOS FUTUROS

A realização deste trabalho permitiu a abertura de novas linhas de pesquisa dentro do tema estudado:

- Avaliar o processo fermentativo em biorreator a partir dos resultados obtidos em frascos agitados;
- Aprimorar as técnicas de purificação do biossurfactante;
- Realizar a caracterização estrutural do biossurfactante purificado;
- Caracterizar os fatores de virulência que a linhagem empregada sintetiza, tais como, fenazinas e proteases;
- Avaliar o cultivo de *resting cells*, livres ou imobilizadas, da linhagem *Pseudomonas sp* LAMI utilizando a glicerina como fonte de carbono e nutrientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, P. F. F., SILVA, J. M., LEHOCK, M., BARROS-TIMMONS, A.M. V., COELHO, M. A.Z., MARRUCHO, I.M., COUTINHO, J.A.P., Production and characterization of a bilemulsifier from *Yarrowia lipolytica*, **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1894 – 1898, 2006.

ARINO, S., MARCHAL, R., VANDECASTEELE, J.-P., Identification and Production of a Rhamnolipid Biosurfactant by a *Pseudomonas* species, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, p. 162 – 168, 1996.

ASHBY, R.D., NUÑEZ, A., SOLAIMAN, D.K.Y., FOGLIA, T.A. Sophorolipid biosynthesis from a biodiesel co-product stream, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 8, n. 9, p. 625 – 630, 2005.

ASHBY, R.D., SOLAIMAN, D.K.Y., FOGLIA, T.A. The use of fatty acids esters to enhance free acid sophorolipid synthesis, **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 253-260, 2006.

ÁVILA FILHO, S., MACHADO, A. S., SANTOS, E. P., Purificação da Glicerina Bruta Vegetal, **Biodiesel, inclusão social**, p. 20-23, 2006.

BANAT, I.M., MAKKAR, R.S., CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants, **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BARBER, W. P., STUCKEY, D. C. Nitrogen Removal in a Modified Anaerobic Baffled Reactor (ABR): 1. Denitrification. **Waters Resources**, v. 34, n. 9, p. 2413-2422, 2000.

BENINCASA, M., **Obtenção de Biotensoativos a partir de Resíduos da Indústria de Óleos Vegetais** (2001). 120 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

BENINCASA, M., CONTIERO, J., MANRESA, M.A., MORAES, I.O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source, **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 283-288, 2002.

BENINCASA, M., ABALOS, A., OLIVEIRA, I., MANRESA, A., Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock, **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 85, p. 1 – 8, 2004.

BHATTACHARYYA, S., GHOSH, M., BHATTACHARYYA, D. K., *Pseudomonas* Strains as Source of Microbial Surface-Active Molecules, **Journal of Oleo Science**, v. 52, n. 4, p. 221 – 224, 2003.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons, **Colloids and Surfaces A**, v. 52, p. 41 – 52, 1999.

BOULTON, C.A., RATLEDGE, C. Biosynthesis of lipid precursors to surfactant production, In: **Biosurfactants and Biotechnology**, ed. Marcel Dekker Inc., New York, 1987, cap. 2, p.47-87.

CAMEOTRA, S.S., MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 5 , p. 520-529, 1998.

CHAYABUTRA, C., WU, J., JU, L., Rhamnolipid Production by *Pseudomonas aeruginosa* under Denitrification: Effects of Limiting Nutrients and Carbon Substrates, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, n. 1, p. 25 – 33, 2001.

CIRIGLIANO, M. C., CARMAN, G. M., Purification and Characterization of Liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 846-850,1985.

COOPER, D. G., GOLDENBERG, B .G. Surface-active agents from two *Bacillus* species, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224 – 229, 1987.

COSTA, S. G. V. A. O., NITSCHKE, M., HADDAD, R., EBERLIN, M. N., CONTIERO, J., Production of *Pseudomonas aeruginosa* LB1 rhamnolipids following growth on brazilian native oils, **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483 – 488, 2006.

D'SOUZA-AULT, M. R., SMITH, L. T., SMITH, G., M., Roles of N-Acetylglutaminylglutamine Amide and Glicine Betaine in Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to Osmotic Stress. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 473-478, 1993.

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

EDWARDS J. R., HAYASHI, J. A., Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*., **Archives of Biochemistry and Biophysics**., v. 111, p. 415 - 421, 1965.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application, **TIBTECH**, v. 10, p. 208 – 217, 1992.

GAUTAM, K. K., TYAGI, V. K., Microbial surfactants: A review, **Journal of Oleo Science**, v. 55, n. 4, p. 155 – 166, 2006.

GARRIDO-LÓPEZ, A., TENA, M. T. Experimental design approach for the optimisation of pressurised fluid extraction of additives from polyethylene films, **Journal of Chromatography A**, v. 1099, n. 1 -2, p. 75 – 83, 2005.

Glicerina de biodiesel inunda mercado no país e derruba preços. 02 de Maio de 2007. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com>. Acesso em: 08 de Fevereiro de 2008.

GOLDMAN, S., SHABTAI, Y., RUBINOVITZ, C., ROSENBERG, E., GUTNICK, D.L., Emulsan in *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1: Distribution of cell-free and Cell-associated Cross-reacting Material, **Applied Environmental Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 165 – 170, 1982.

GONÇALVES, V.L.C., PINTO, B.P., MUSGUEIRA, L.C., SILVA, J.C.; MOTA, C.J.A., Biogasolina: Produção de éteres e ésteres da glicerina, **Biodiesel, inclusão social**, p. 14 – 19, 2006.

GREEK, B.F., Detergency industry ponders product for new decade, **Chemistry Engineering News**, v. 68, p. 37 – 38, 1990.

GUERRA-SANTOS, L., KÄPPELI, O., FIECHTER, A., *Pseudomonas aeruginosa* Biosurfactant Production in Continuous Culture with Glucose as Carbon Source, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 301 – 305, 1984.

GUNTHER IV, N. W., NUÑEZ, A., FETT, W., SOLAIMAN, D. K. Y., Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a Nonpathogenic Bacterium, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2288 – 2293, 2005.

HERNANDEZ, D., ROWE, J. J. Oxygen Regulation of Nitrate Uptake in Denitrifying *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 745-750, 1987.

HERNANDEZ-ANGUIANO, A. M., SUSLOW, T. V., LELOUP, L., KADO, C. I., Biosurfactants produced by *pseudomonas fluorescens* and soft-rotting of Harvest Florets of Broccoli and Cauliflower, **Plant Pathology**, v. 53, p. 596 – 601, 2004.

ISHIGAMI, Y., SUZUKI, S., Development of biochemical-functionalization of biosurfactants and natural dyes, **Progress in Organic Coatings**, v. 31, p. 51 – 61, 1997.

JARVIS, F. G., JOHNSON, M. J., A Glyco-lipide Produced by *Pseudomonas aeruginosa*, **American Chemical Society**, v. 71, p. 4124 – 4126, 1949.

KARINEN, R.S., KRAUSE, A.O.I. New biocomponents from glycerol, **Applied Catalisys A: General**, v. 306, p. 128-133, 2006.

KOSARIC, N., Biosurfactants in industry, **Pure & Applied Chemistry**, v. 64, n.11, p. 1731-1737, 1992.

Kuo, T.M., NAKAMURA, L. K. Diversity of oleic acid, ricinoleic acid and linoleic acid conversions among *Pseudomonas aeruginosa* strains, **Current Microbiology**, v. 49, p. 261 – 266, 2004.

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

MANRESA, M. A., BASTIDA, J., MERCADÉ, M.E., ROBERT, M., ANDRÉS C. de, ESPUNY, M. J., GUINEA, J. Kinetics Studies on Surfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 8, p. 133-136, 1991.

MATSUFUJI, M., NAKATA, K., YOSHIMOTO, A., High Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol, **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 12, p. 1213 – 1215, 1997.

MERCADE, M.E., MANRESA, M.A. The use of agroindustrial by-products por biosurfactants production, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n.1, p. 61-64, 1994.

MOTA, C.J.A., PERES, S., RAMOS, L.P. **Relatório de Co-produtos do Biodiesel apresentado no Seminário de Co-produtos do Processo de Produção do Biodiesel**, 30-31 de Maio de 2005, Rio de Janeiro, Brasil, 2005.

MULLIGAN, C. N., GIBBS, B. F., Correlation of Nitrogen Metabolism with Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology** v. 55, n. 11, p. 3016-3019, 1989.

MULLIGAN, C. N., MAHMOURIDES, G., GIBBS, B. F. The Influence of Phosphate Metabolism on Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 199-210, 1989.

NBR 10441: Produtos de petróleo – Líquidos transparentes e opacos – Determinação da viscosidade cinemática e cálculo da viscosidade dinâmica. Rio de Janeiro, 2002.

NITSCHKE, M., SIDDHARTHA, G. V. A. O., CONTIERO, J. Rhamnolipids Surfactants: An Update on the General Aspects of these Remarkable Biomolecules, **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1593-1600, 2005.

OSMAN, M., ISHIGAMI, Y., SOMEYA, J., JENSEN, H. B., The Bioconversion of Ethanol to Biosurfactants and Dye by a Novel Coproduction Technique, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 7, 1996.

PAPANIKOLAOU, S., RUIZ-SANCHEZ, P., PARISET, B., BLANCHARD, F., FICK, M., High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain, **Journal of Biotechnology** v. 77 n. 2-3, p. 191-208, 2000.

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol, **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 4, p.737-744, Abril, 2002.

PARENTE, E. J. S., **Biodiesel: Uma Aventura Tecnológica num País Engraçado**, Fortaleza, 2003, 68p.

PHAM, T. H., WEBB, J. S. & REHM, B. H. A. The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. **Microbiology**, v. 150, p. 3405-3413, 2004.

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

RAMANA, K. V., KARANTH, N. G., Production of Biosurfactants by the Resting Cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFRT – 6, **Biotechnology Letters**, v. 11, n. 6, p. 437 – 442, 1989.

Rathmann, R., Benedetti, O., Plá, J. A., Padula, A. D., Biodiesel: Uma Alternativa Estratégica na Matriz Energética Brasileira? Porto Alegre, 2006. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br>>. Acesso em: 08 de Fevereiro de 2008.

ROCHA, M. V. R., OLIVEIRA, A. H. S., SOUZA, M. C. M., GONÇALVES, L. R. B. Natural Cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1295-1299, 2006.

ROCHA, M. V. P., SOUZA, M. C. M., CAVALCANTE, G. P., MACEDO, G. R., PINTO, G. A. S., GONÇALVES, L. R. B. Factors affecting the production of biosurfactants using *Pseudomonas aeruginosa* and cashew apple juice as culture medium. In: XXII IACChE, 2006.

RODRIGUES, L., TEIXEIRA, J., OLIVEIRA, R., van der MEI, H. C. Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. **Process Biochemistry**, v. 41 p. 1–10, 2006.

SABRA, W., KIM, E., ZENG, A., Physiological responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic and aerobic cultures, **Microbiology**, v. 148, p. 3195 – 3202, 2002.

SANTA ANNA, L. M. M. **Produção e Aplicação de Rhamnolipídeo na Remediação de Solos Impactados por Óleo**. 2005. 155 f. Tese (Doutorado em Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

SANTA ANNA, L.M., SEBASTIAN, G.V., MENEZES, E.P., ALVES, T.L.M., SANTOS, A.S. PEREIRA Jr., N., FREIRE, D.M.G. Production of Biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 Isolated in Oil Environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n.2, p. 159-166, 2002.

SANTOS, A. S. **Produção de Rhamnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa***. 2003. 110 f. Tese (Doutorado em Ciência Bioquímica) Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

SCHENK, T., SCHUPHAN, I., SCHMIDT, B., High-performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*, **Journal of Chromatography A**, v. 693, p. 7 – 13, 1995.

SEBRAE, **Biodiesel**, São Paulo, 2007. 64 p.

SHARMA, A., JANSEN, R., NIMTZ, M., JOHRI, B., N., WRAY, V., Rhamnolipids from the Rhizosphere Bacterium *Pseudomonas* sp GRP₃ that Reduces Damping-off Disease in Chilli and Tomato Nurseries, **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 6, p. 941 – 947, 2007.

SOBERÓN-CHAVES, G., LÉPINE, F., DÉZIEL, E. Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p. 718-725, 2005.

SYLDATK, C., LANG, S., MATULOVIC, U., WAGNER, F. Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874, **Z. Naturforsch**, v. 40c, p. 61-67, 1985.

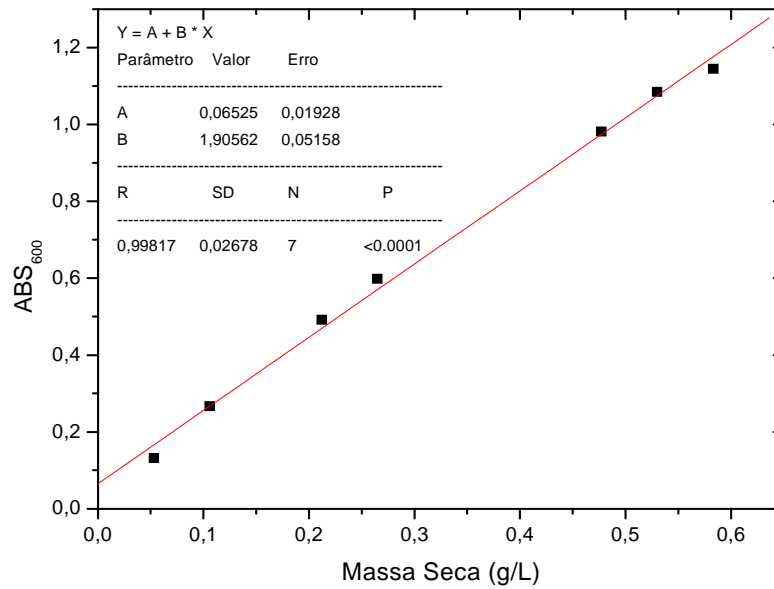
SYLDATK, C., WAGNER, F. Production of Biosurfactants, In: **Biosurfactants and Biotechnology**, ed. Marcel Dekker Inc., New York, 1987, cap. 3, p.89 - 119.

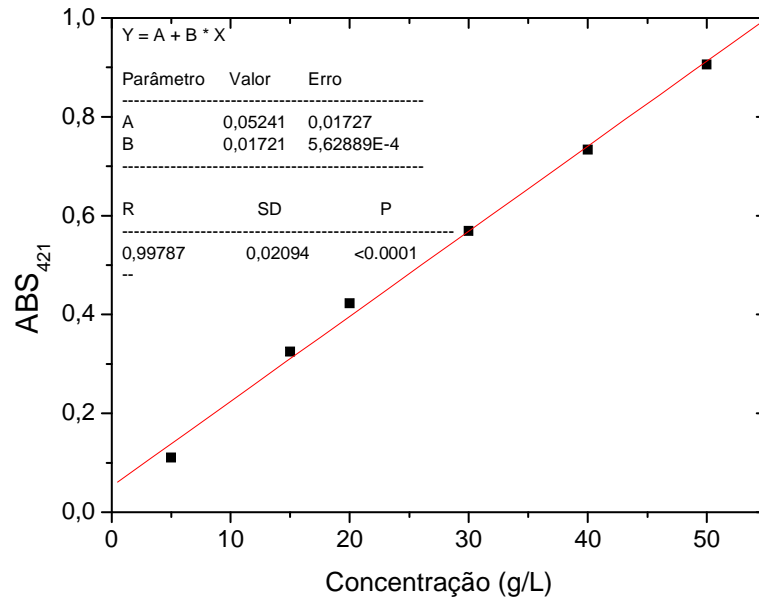
TURKOVSKAYA, O. V., DMITRIEVA, T. V., MURATOVA, A. Y., A Biosurfactant-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Strain, **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 71 – 75, 2001.

TYSON, K., S., DOE analysis of fuels and coproducts from lipids, **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1127 – 1136, 2005.

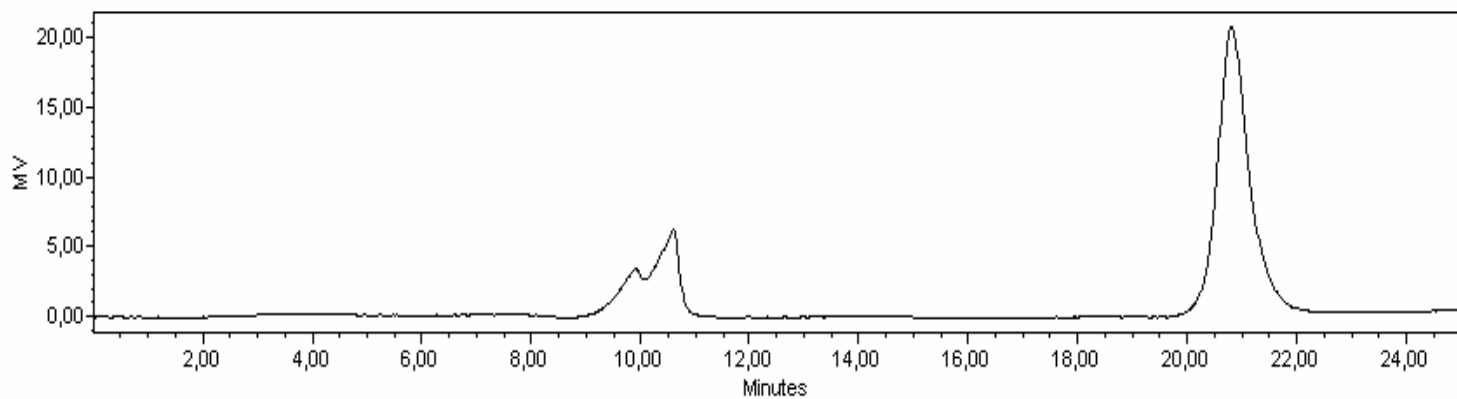
WEI, Y., CHOU, C., CHANG, J. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* originating from petrochemical wastewater, **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 146-154, 2005.

ANEXO A - Curva padrão de biomassa para *P. aeruginosa* LAMI obtida a partir do cultivo em caldo nutritivo sob agitação de 150rpm a 30°C e 72 horas de cultivo.



ANEXO B – Curva padrão de ramnose obtida de acordo com método orcinol-sulfúrico

ANEXO C – Cromatograma obtido para o glicerol a partir de análise em HPLC com água MiliQ como fase móvel.



ANEXO D - Espectro de RMN H^1 em solvente CD_3OD do ramnolípido produzido por *P. aeruginosa* LAMI referente ao produto 2 obtido por CCD.

