



ELISA MARA PRIOLI CIAPINA

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR
Rhodococcus erythropolis EM BIORREATOR
DE BANCADA E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO
NA BIODEGRADAÇÃO DE BORRA OLEOSA
DA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO**

UFRJ/EQ
2008

**PRODUÇÃO DE BIODISSURFACTANTE POR
Rhodococcus erythropolis EM BIORREATOR
DE BANCADA E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO
NA BIODEGRADAÇÃO DE BORRA OLEOSA
DA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO**

ELISA MARA PRIOLI CIAPINA

Tese Apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Tecnologia de
Processos Químicos e Bioquímicos para a
Obtenção do Grau de Doutor em Tecnologia
de Processos Químicos e Bioquímicos

ORIENTADORES

Prof. Nei Pereira Jr, *PhD*
Prof. Denise Maria Guimarães Freire, *DSc*

Rio de Janeiro
2008

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Rhodococcus erythropolis* EM BIORREATOR DE BANCADA E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO NA BIODEGRADAÇÃO DE BORRA OLEOSA DA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO

ELISA MARA PRIOLI CIAPINA

Tese submetida ao corpo docente da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor.

Aprovada por:

Prof. Nei Pereira Jr., *PhD* (Orientador) - EQ/UFRJ

Prof^ª. Denise Maria Guimarães Freire, *DSc* (Orientadora) - IQ/UFRJ

Prof^ª. Eliana Alhadeff, *DSc* - EQ/UFRJ

Profa. Eliana Flávia Camporese Sérvulo, *DSc* – EQ/UFRJ

Lídia Maria Melo Santa Anna, *DSc* - PETROBRAS/CENPES

Prof^ª. Magali Christe Cammarota, *DSc* - EQ/UFRJ

Prof^ª. Vivian Helena Pellizari, *DSc* - ICB/USP

Rio de Janeiro
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Ciapina, Elisa Mara Prioli.

Produção de Biossurfactante por *Rhodococcus erythropolis* em Biorreator de Bancada e Avaliação do seu Efeito na Biodegradação de Borra Oleosa da Indústria do Petróleo/ Elisa Mara Prioli Ciapina – Rio de Janeiro, 2008

Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Instituto de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – EQ, 2008.

Orientadores: Nei Pereira Jr.
Denise Maria Guimarães Freire

1. Biossurfactante. 2. *Rhodococcus*. 3. Biodegradação. 4. Surfactantes. 5. Biosurfactant – Teses. I. Pereira Jr., Nei (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. III. Título

***DEDICO este trabalho aos meus
pais, minhas irmãs, meu marido
e meu filho Pedro, sempre
juntos de mim.***

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora Aparecida por estarem sempre comigo e iluminarem meu caminho;

Ao Prof. Nei Pereira Jr., por ter me acolhido com carinho e respeito em seus laboratórios, pela compreensão e por sua preciosa orientação;

À Prof^a. Denise Maria Guimarães Freire, pela paciência, orientação e ensinamentos;

Ao Dr. Alexandre Santos, pelo auxílio no início dos trabalhos;

Ao professor Márcio Nele de Souza, por possibilitar a realização das análises de tensão superficial em seu laboratório;

Ao meu marido Vilmar, pela ajuda, compreensão e paciência ao longo da realização desta Tese;

Ao Gabriel, por sua generosa amizade, auxílio para enfrentar as dificuldades durante a execução da Tese e ensinamentos;

Ao Vitor, estagiário, pela ajuda e dedicação prestadas ao trabalho e, principalmente, pelo carinho demonstrado por mim;

À Mariana, pela amizade, apoio e ensinamentos;

A todos do Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos, pela ajuda na execução do trabalho mas, principalmente, pelo cuidado que tiveram comigo durante minha gravidez;

Ao Luís e ao Jorge, pelo auxílio em questões burocráticas do laboratório;

Às pessoas da Secretaria de Pós-graduação, pelo auxílio na parte burocrática envolvida na execução da Tese;

À FAPERJ, pela concessão da Bolsa de Estudo;

Ao PROAP, pelo auxílio financeiro na execução do trabalho.

RESUMO

CIAPINA, Elisa Mara Prioli Ciapina. Produção de Biossurfactante por *Rhodococcus erythropolis* em Biorreator de Bancada e Avaliação do seu Efeito na Biodegradação de Borra Oleosa da Indústria do Petróleo. Orientadores: Nei Pereira Jr. e Denise Maria Guimarães Freire. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2008. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos).

Biossurfactantes são tensoativos de origem microbiana que podem substituir os surfactantes sintéticos, pois suas vantagens são a baixa toxicidade, biodegradabilidade, e podem ser produzidos a partir de substratos renováveis. Essas moléculas de natureza anfipática têm aplicação em diversos setores industriais e na biorremediação. O objetivo geral deste trabalho foi contribuir para o desenvolvimento de um processo para a produção de biossurfactante por uma linhagem de *Rhodococcus erythropolis* e verificar seu efeito na biodegradação de borra oleosa. A cinética de produção do biossurfactante foi estabelecida em experimentos em biorreator. O tensoativo foi recuperado do meio fermentado, caracterizado físico-quimicamente e aplicado na biodegradação de uma borra oleosa. Os resultados da melhor condição para produção foram: 2% de glicerol, NaNO₃ C/N 5, a 37°C, em batelada simples, obtendo-se $0,31 \pm 0,03$ g/L do produto e Q_P de 12 mg/L.h. A condução do bioprocessamento por batelada alimentada aumentou a produção do tensoativo para $0,97 \pm 0,05$ g/L e Q_P de 30 mg/L.h. O solvente mais indicado para recuperação do surfactante foi etanol (- 4°C) 95% (4:1). O biossurfactante bruto reduziu a tensão superficial da água para $43,4 \pm 2,1$ mN/m, a tensão interfacial para $13 \pm 2,1$ mN/m, a atividade emulsificante foi de 66% e a CMC foi de 0,42 g/L. O biossurfactante teve aplicação restrita em faixas de pH ≥ 7 . A produção do biossurfactante foi equivalente a $18,51 \pm 0,95$ g/L em massa seca. O biossurfactante aplicado em concentrações \leq CMC apresentou potencial na biodegradação de borra oleosa, pois estimulou a atividade dos microrganismos autóctones e não teve efeito tóxico sobre eles.

ABSTRACT

CIAPINA, Elisa Mara Prioli Ciapina. Produção de Biossurfactante por *Rhodococcus erythropolis* em Biorreator de Bancada e Avaliação do seu Efeito na Biodegradação de Borra Oleosa da Indústria do Petróleo. Orientadores: Nei Pereira Jr. e Denise Maria Guimarães Freire. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2008. Tese (doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos).

Biosurfactants are surface-active agents of microbial origin that can replace the synthetic surfactants since they have advantages over chemical surfactants as lower toxicity, biodegradability and they can be produced from renewable-resources. These molecules of amphipatic nature have applications in industrial area and in bioremediation processes. The general objective of this work was to contribute to the development of the process for biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* and verify its effect on the biodegradation process of hydrophobic compounds. The kinetics of biosurfactant production was established in bioreactor experiments. The surface-agent was recovered from the medium, physical-chemically characterized and applied in the biodegradation of oily sludge. The results of the best condition for production resulted in: 2% glycerol, NaNO₃ C/N 5, at 37°C, in batch wise operator, obtain $0,31 \pm 0,03$ g/L of the product and Q_P of 12 mg/L.h. The bioprocess also operate by feed batch increased the biosurfactant production up to $0,97 \pm 0,05$ g/L and Q_P 30 mg/L.h. The solvent more appropriated to recover the surfactant was cold ethanol 95% (4:1). The biosurfactant reduced the surface tension of water to $43,4 \pm 2,1$ mN/m, and interfacial tension with hexadecane to $13 \pm 2,1$ mN/m, Emulsification Index (E₂₄) of 66% and CMC of 0,42 g/L. The biosurfactant had restrictive application in pH ≥ 7 . The biosurfactant produced measured gravimetrically (after precipitation) was equivalent $18,51 \pm 0,95$ g/L dry. The crude biosurfactant, at concentration \leq CMC, showed potential application in the biodegradation of oily sludge because it stimulated the indigenous microorganism activity and presented no toxic effect.

ABREVIATURAS

C/N: Carbono/Nitrogênio

CMC: Concentração Micelar Crítica

E₂₄: Índice de Emulsificação após 24 horas

EPS: Polissacarídeo Extracelular

h: hora

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Performance

EC₅₀: Concentração de Efeito de Redução da Luminescência para 50% da população-teste

LC/MS: Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas

m/v: massa/volume

Q_P: Produtividade volumétrica, mg/L.h

RPS: Redução Percentual de Substrato

RPM: rotações por minuto

SAO: Separador água/óleo

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

tg: tempo de geração, h

TFA: Ácido Trifluoracético

TSA: Tryptic Soy Agar

TI: Tensão Interfacial

TS: Tensão Superficial

UFC/g: Unidade Formadora de Colônia/grama

USP/SP: Universidade de São Paulo/ São Paulo

v/v: volume/volume

Y_{P/S}: Fator de rendimento em produto por substrato consumido, g/g

Y_{P/X}: Fator de rendimento em produto por biomassa, g/g

μ_x: taxa específica de crescimento, h⁻¹

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Principais biossurfactantes e microrganismos produtores (DESAI e BANAT, 1997).....	10
Tabela 2.2 – Comparação das propriedades superficiais, interfaciais e CMC de biossurfactantes e surfactantes quimicamente sintetizados (CHRISTOFI e IVSHINA, 2002)	11
Tabela 2.3 - Produção de biossurfactantes por diferentes microrganismos em substrato de baixo valor agregado (MANEERAT, 2005 e MUTHUSAMY e col., 2008).....	21
Tabela 2.4 - Métodos de separação dos biossurfactantes e suas vantagens. Adaptado de DESAI e BANAT (1997) e MUTHUSAMY e col. (2008).....	22
Tabela 2.5 - Custo do biossurfactante e do surfactante (KOSARIC e col.,1994)	23
Tabela 2.6 – Aplicações dos surfactantes em diversos setores industriais (SINGH e col., 2007)	34
Tabela 2.7 - Toxicidade de biossurfactantes comparada aos surfactantes sintéticos (IVSHINA e col., 1998).....	38
Tabela 2.8 - Trabalhos relevantes nos quais foram verificadas as condições de cultivo, a concentração (g/L) de biossurfactantes produzidos por <i>Rhodococcus</i> sp e suas características físico-químicas.....	39
Tabela 4.1 – Composição do meio de cultivo para produção do biossurfactante.....	50
Tabela 4.2 - Caracterização do resíduo oleoso de fundo de separador O/A de Unidade de Exploração & Produção da Petrobrás em Sergipe e Alagoas. (MELO, 2004).....	61
Tabela 5.1 - Concentração de biossurfactante (em g/L) obtidos antes e após sonicação do meio fermentado e Índice de Emulsificação (E ₂₄) do meio sonicado livre de células.....	64
Tabela 5.2 - Concentração de biossurfactante (em g/L) obtida no experimento em biorreator antes e após sonicação do meio fermentado.....	67

Tabela 5.3 – Parâmetros do bioprocesso realizados a 28° e 37°C.....	71
Tabela 5.4 – Parâmetros do bioprocesso realizado em biorreator, a 37°C, em diferentes fontes de nitrogênio.....	77
Tabela 5.5 – Parâmetros estimados dos experimentos realizados em biorreator, a 37°C, em diferentes razão C/N.....	82
Tabela 5.6 – Características físico-químicas do biossurfactante produzido por <i>Rhodococcus erythropolis</i> nas condições de cultivo empregadas.....	92
Tabela 5.7 – Contagem da microbiota autóctone da borra oleosa em 168 horas.....	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 - Forças de atração entre moléculas na superfície e no interior de um líquido (SALIN e col., 2003).....	7
Figura 2.2 – Representação do efeito da variação da concentração do surfactante em solução aquosa.....	8
Figura 2.3 – Estrutura molecular dos glicolipídeos. A) Raminolipídeo; B) Soforolipídeo; C) Trealoselipídeo (DESAI e BANAT, 1997).....	12
Figura 2.4 – Estrutura molecular do EMULSAN (DESAI e BANAT, 1997).....	13
Figura 2.5 – Estrutura molecular da surfactina (DESAI e BANAT, 1997).....	14
Figura 2.6 - Organização do envelope celular em <i>Rhodococcus</i> : representação esquemática de um modelo proposto. (A) barreira lipídica externa formada por ácidos micólicos e (B) lipídeos anfifílicos (SUTCLIFFE, 1998)	36
Figura 4.1 – Colônias de <i>Rhodococcus erythropolis</i> crescidas em meio de cultura TSA, a 28°C.	49
Figura 4.2 - Biorreator modelo Biostat® B (B. Braun Biotech International – Alemanha)	51
Figura 4.3 – Respirômetro Bioscience/BI -2000	62
Figura 5.1 – Perfil cinético do bioprocesso evidenciando o crescimento celular, o consumo de glicerol e a produção de biosurfactante a 28°C.....	68
Figura 5.2 – Perfil cinético do bioprocesso mostrando crescimento celular, consumo de glicerol e produção de biosurfactante a 37°C.....	70
Figura 5.3 – (A) Fermentação realizada a 37°C e (B) Colônias de <i>Rhodococcus erythropolis</i> após a fermentação, crescidas em meio TSA.....	72
Figura 5.4 - Perfis cinéticos dos bioprocessos realizados em biorreator com 2% glicerol, a 37°C, variando-se as fontes de nitrogênio, mantendo a C/N de 14. A) Sulfato de Amônio; B) Nitrato de Sódio; C) Sulfato de Amônio e Nitrato de Sódio.	74

Figura 5.5 – Efeito das diferentes fontes de nitrogênio na produção do biossurfactante e no fator de rendimento em produto por célula ($Y_{P/X}$).....	76
Figura 5.6 – Perfis cinéticos dos bioprocessos realizados em condições diferentes de C/N. A) C/N 40; B) C/N 14; C) C/N 5.....	79
Figura 5.7 – Efeito da razão C/N na produção do biossurfactante e produtividade volumétrica do processo.	81
Figura 5.8 – Perfil cinético do bioprocesso conduzido em batelada alimentada de glicerol, C/N 5, a 37°C. A seta indica o início da alimentação no processo..	84
Figura 5.9 – Produção do biossurfactante obtida nos estudos da fonte de nitrogênio (1, 2 e 3); razão C/N (4, 5 e 6) e batelada alimentada (7).....	85
Figura 5.10 - Precipitação de biossurfactante com etanol (-4°C) 95%. A) precipitação do biossurfactante com etanol (-4°C) 95% no meio fermentado; B) precipitação do biossurfactante após lavagem com etanol (-4°C) 95%; C) precipitado isolado.	86
Figura 5.11 – Recuperação do biossurfactante do meio fermentado concentrado após precipitação com diferentes solventes em diferentes volumes solvente:amostra. (1 – acetona 4:1; 2 – acetona 3:1; 3 - etanol 95% 4:1; 4 – etanol 95% 3:1; 5 – etanol 95% com 5% metanol 4:1; 6 - etanol 95% com 5% metanol 3:1; 7 – isopropanol 4:1; 8 – isopropanol 3:1).....	88
Figura 5.12 – Influência do volume de etanol (-4°C) 95% em relação ao meio fermentado, não concentrado, na recuperação do biossurfactante.....	89
Figura 5.13 - Concentração do biossurfactante após métodos de extração de polissacarídeos da parede celular.	91
Figura 5.14 - Emulsificação do sistema n-hexadecano/solução de biossurfactante em diferentes concentrações. Da direita para a esquerda, soluções de 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 g/L de biossurfactante.....	93
Figura 5.15 - Concentração Micelar Crítica obtida a partir do biossurfactante bruto diluído em água destilada.	94
Figura 5.16 - Variação da Tensão Superficial da solução 0,6 g/L de biossurfactante bruto em função do pH.....	96
Figura 5.17 - Relação da quantificação do biossurfactante pelo método fenol-sulfúrico e por massa seca.	98

- Figura 5.18 – Cromatograma de HPLC do biossurfactante bruto hidrolisado, mostrando três picos (setas) que coincidem com glicose, galactose e manose, respectivamente..... 99
- Figura 5.19 – Curvas de consumo de oxigênio acumulado na biodegradação da borra oleosa frente a diferentes concentrações de biossurfactante..... 102

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - APRESENTAÇÃO DO TEMA.....	1
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Surfactantes.....	5
2.2 Surfactantes Biológicos – Biossurfactantes.....	9
2.2.1 Glicolipídeos.....	11
2.2.2 Ácidos graxos, Lipídeos Neutros e Fosfolipídeos.....	12
2.2.3 Biossurfactantes Poliméricos.....	13
2.2.4 Lipopeptídios.....	14
2.3 Vantagens e Desvantagens dos Biossurfactantes.....	14
2.4 Funções Fisiológicas dos Biossurfactantes.....	16
2.5 Produção de Biossurfactantes.....	17
2.6 Recuperação dos Biossurfactantes.....	22
2.7 Biossurfactantes versus Surfactantes.....	23
2.8 Aplicações dos Biossurfactantes.....	25
2.9 Bactérias do Gênero <i>Rhodococcus</i>	34
2.9.1 Produção de Biossurfactante por <i>Rhodococcus</i> sp.....	38
2.10 Considerações Gerais.....	45
CAPÍTULO 3 - JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS.....	47
CAPÍTULO 4 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1 Microrganismo.....	49
4.1.1 Preparo de Inóculo.....	50
4.2 Meio de Cultivo	50

4.3	Estudo das Condições de Cultivo para Melhorar a Produção De Biossurfactante por <i>Rhodococcus</i> sp.....	51
4.4	Métodos Analíticos.....	52
4.4.1	Determinação da Produção de Biossurfactante.....	52
4.4.2	Medida da Concentração Celular.....	52
4.4.3	Dosagem de Glicerol.....	53
4.4.4	Dosagem de Nitrogênio.....	53
4.4	Recuperação do biossurfactante do Meio fermentado Livre de células.....	54
4.5.1	Seleção de Solvente para Recuperação do Biossurfactante por Precipitação.....	55
4.5.2	Estudo da Recuperação do Biossurfactante por Precipitação com Etanol (-4°C).....	55
4.6	Extração do Polissacarídeo Aderido à Parede Celular.....	56
4.7	Quantificação do Biossurfactante por Massa Seca.....	57
4.8	Caracterização Físico-Química do Biossurfactante.....	58
4.8.1	Influência do pH na Tensão Superficial.....	59
4.9	Caracterização Parcial da Estrutura do Biossurfactante.....	59
4.9.1	Hidrólise Ácida.....	59
4.9.2	Dosagem de Proteína	60
4.10	Estudo do Efeito do Biossurfactante na Biodegradação de Borra Oleosa da Indústria do Petróleo.....	61
CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO		63
5.1	Produção do Biossurfactante.....	63
5.1.1	Fonte de Carbono.....	63
5.1.2	Influência da Temperatura.....	68
5.1.3	Influência da fonte de nitrogênio.....	73

5.1.4	Estudo da Razão C/N na Produção do Biossurfactante...	78
5.1.5	Produção de Biossurfactante em Batelada Alimentada por Pulsos.....	83
5.1.6	Evolução dos Resultados da Produção de Biossurfactante por <i>Rhodococcus erythropolis</i> em Biorreator de Bancada.....	84
5.2	Recuperação do Biossurfactante do Meio Fermentado Livre de Células.....	85
5.2.1	Seleção de Solvente para Recuperação por Precipitação do Biossurfactante.....	88
5.2.2	Estudo da Recuperação do Biossurfactante por Precipitação com Etanol 95%.....	89
5.2.3	Extração do Polissacarídeo Aderido à Parede Celular.....	90
5.3	Caracterização Físico-Química do Biossurfactante Bruto.....	91
5.3.1	Influência do pH na Tensão Superficial.....	96
5.4	Relação entre a Quantificação do Biossurfactante pelo Método Colorimétrico Fenol-Sulfúrico e por Massa Seca.....	97
5.5	Caracterização Parcial da Estrutura do Biossurfactante.....	99
5.6	Estudo do Efeito do Biossurfactante na Biodegradação de Borra Oleoso da Indústria do Petróleo.....	101
CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES.....		106
CAPÍTULO 7. - RECOMENDAÇÕES.....		109
CAPÍTULO 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		111

CAPÍTULO 1

APRESENTAÇÃO DO TEMA

Biossurfactantes são compostos tensoativos produzidos por microrganismos em condições específicas de crescimento. Estes apresentam propriedades e características similares aos surfactantes quimicamente sintetizados.

Devido a sua natureza anfipática, estas moléculas, tanto biológicas como sintéticas, são capazes de reduzir as tensões superficial e interfacial de sistemas água/ar e água/óleo. Podem apresentar como propriedade: aumento da adsorção de moléculas; formação de micelas; formação de macro e microemulsões; aumento da dispersão ou agregação de sólidos; ação espumante; aumento da solubilidade e aumento da molhabilidade.

Os surfactantes constituem uma importante classe de produtos na indústria química, sendo utilizados nas indústrias farmacêutica, petroquímica;

de cosméticos, têxtil, de produtos de limpeza, na agricultura, medicina e em tecnologia ambiental em processos de biorremediação.

A maioria dos surfactantes comercializados é sintetizada quimicamente, a partir do petróleo como matéria-prima. Como consequência, muitos destes compostos apresentam alta toxicidade e não são facilmente biodegradados, ao contrário dos biossurfactantes que apresentam vantagens como baixa toxicidade e biodegradabilidade, o que permite que sejam aplicados no ambiente sem necessitar de tratamento adicional. O uso de biossurfactante é uma alternativa para o problema gerado pelos surfactantes sintéticos quando aplicados em processo de biorremediação.

Os biossurfactantes podem ser produzidos “in situ” e ainda, a partir de substratos renováveis, como por exemplo, óleos vegetais, resíduos agroindustriais e subprodutos da indústria do petróleo e alimentícia.

O crescente desenvolvimento industrial dos últimos tempos gerou grande preocupação com a preservação ambiental devido ao aumento gradual da produção e a liberação de diversos tipos de resíduos no meio ambiente. Dentre os resíduos poluidores pode-se destacar os hidrocarbonetos derivados do petróleo. O uso e a disposição final inadequada dos mesmos resultaram na contaminação de diversos ecossistemas como o solo, sedimentos e águas superficiais e subterrâneas, apresentando implicações globais.

Somado a isto, a prospecção, processamento e transporte de petróleo e derivados trouxe, por razões intrínsecas, a possibilidade de acidentes que necessitam de ações coordenadas no emprego de tecnologias ambientais eficientes e limpas em sua resolução. Nos últimos anos, acidentes envolvendo derramamento de milhares de toneladas de óleo, através de vazamentos em dutos, navios cargueiros ou em plataformas de prospecção de petróleo, infligiram agressões ambientais em solos, mares e rios que necessitarão de anos ou décadas para recuperação dos ecossistemas atingidos.

Portanto, a necessidade de recuperar ou remediar os ambientes poluídos favorece o estudo e desenvolvimento de diferentes tecnologias para recuperação ambiental. O uso de biossurfactantes apresenta papel importante na

biorremediação destes ambientes, pois possibilitam a emulsão e aumento da solubilidade destes compostos hidrofóbicos, disponibilizando-os para a biodegradação e promovendo a aceleração desse processo.

A produção de surfactantes microbianos em escala comercial ainda não foi completamente atingida devido aos baixos rendimentos e altos custos de produção. Para isto, seria necessário que fossem produzidos e recuperados de forma mais lucrativa e em grande escala.

Nas últimas décadas, a produção de biossurfactantes por microrganismos dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Candida*, em diferentes condições de cultivo, tem sido intensamente estudada, no que diz respeito à otimização da produção em substratos economicamente viáveis. Entretanto, um grande grupo de microrganismos produtores de biossurfactantes que pertence ao gênero *Rhodococcus* tem sido pouco explorado para produção econômica dos biossurfactantes.

Bactérias do gênero *Rhodococcus* apresentam uma ampla diversidade metabólica que garante sua sobrevivência em condições adversas de crescimento e possibilitam sua colonização em diversos nichos ecológicos. O conhecimento desses metabólitos gerados pode ser de grande valia para o interesse biotecnológico. Este é o caso dos diferentes tipos de surfactantes produzidos por cepas de *R. ruber*, *R. erythropolis*, *R. rodochrous*, *R. opacus*, que apresentam potencial tecnológico pouco estudado.

Desta forma, o tema desta tese vem ao encontro das necessidades de se explorar a capacidade metabólica de *Rhododoccus* spp, no que diz respeito à produção de biossurfactantes, a fim de se obter parâmetros de produção que permitam direcionar o desenvolvimento tecnológico do bioprocessos, e sua aplicação em processos de biodegradação.

Esta Tese apresenta, no Capítulo 2, uma revisão bibliográfica apontando as vantagens e desvantagens do uso dos biossurfactantes biológicos comparados aos seus homólogos sintéticos, destaca a produção dos biossurfactantes em diferentes condições de cultivo, bem como suas aplicações em remediação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos e

metais pesados. No Capítulo 3, são apresentadas as justificativas e objetivos que nortearam o desenvolvimento deste trabalho. Posteriormente, no Capítulo 4, descrevem-se as metodologias empregadas, tanto referente à cinética de produção do biossurfactante por *Rhodococcus erythropolis*, bem como as relacionadas às estratégias para sua recuperação e aplicação deste na biodegradação de borras oleosas. No Capítulo 5 os resultados são exibidos e discutidos, com posterior conclusão (Capítulo 6) e recomendações (Capítulo 7) para continuidade dos estudos, visando avanços na produção do tensoativo produzido por esta linhagem bacteriana.

Os resultados obtidos neste trabalho, até o momento, geraram duas publicações.

- Periódico indexado

- CIAPINA, E. M. P.; MELO, W. C.; SANTA ANNA, L. M. M.; SANTOS, A. S. ; FREIRE, D. M. G. E PEREIRA Jr. N. Biosurfactant Production by *Rhodococcus erythropolis* Grown on Glycerol as Carbon Source. Applied Biochemistry and Biotechnology, vol. 129- 132, 880-886, 2006.

- Trabalho completo em Anais do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2007.

- Elisa Mara Prioli Ciapina, Vitor Pereira Carvalho, Gabriel Jaime Betancur-Vargas, Tárin Macedo, Denise M. Guimarães Freire e Nei Pereira Jr. Estudo da Produção de Biossurfactante por *Rhodococcus erythropolis* em Biorreator de Bancada.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Surfactantes

Surfactantes (SURFace ACTive AgeNTS) são compostos que apresentam um caráter anfipático, por serem constituídos por moléculas polar ou hidrofílica e apolar ou hidrofóbica. A parte hidrofílica é constituída por grupamentos aniônicos, catiônicos ou não-iônicos, enquanto a parte hidrofóbica geralmente é um hidrocarboneto, que pode ser linear ou ramificado (FIECHTER, 1992).

Devido a presença de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos na mesma molécula, os surfactantes acumulam na interface entre fases de diferentes graus de polaridade, tais como óleo/água, ar/água ou água/sólido, ocasionando redução das tensões superficiais e interfaciais destes sistemas (BANAT e col., 2000). Essas alterações são decorrentes de interações hidrofóbicas/hidrofílicas e formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas (FIECHTER, 1992).

Como principais propriedades que caracterizam os surfactantes podem-se citar: aumento da adsorção de moléculas; formação de micelas; formação de macro e microemulsões; aumento da dispersão ou agregação de sólidos; ação espumante, aumento da solubilidade, e molhabilidade ou detergência.

A principal característica de um agente tensoativo é formar concentrações diferenciadas quando em solução, sendo a concentração do surfactante na superfície muito maior do que no seio do líquido (PORTER, 1994). No interior do líquido, as moléculas são atraídas igualmente em todas as direções, sendo a distância média entre elas resultante do balanço entre forças atrativas, que possibilitam a aproximação das moléculas, e forças repulsivas, que impedem que duas moléculas ocupem o mesmo espaço. Por outro lado, as moléculas na superfície livre do líquido apresentam forças diferenciadas resultando em um comportamento distinto. Neste caso, as moléculas praticamente não apresentam forças atrativas para fora do líquido, conseqüentemente sendo atraídas em direção ao seio do líquido (Figura 2.1). Do mesmo modo, em um sistema constituído por dois líquidos imiscíveis, tem-se que as moléculas presentes na interface sofrem forças de atração do líquido de maior densidade (BRADY e HUMISTON, 1981).

A tensão superficial de um líquido pode ser definida como a quantidade de trabalho (força por unidade de comprimento) necessária para expandir o filme na superfície líquido-gás. Esta quantidade de trabalho é dependente da intensidade das forças das moléculas dirigidas para o interior do líquido. A tensão superficial também depende da temperatura do líquido, já que um aumento da temperatura, que propicia um aumento da energia cinética das moléculas individualmente, reduz as forças atrativas intermoleculares. Como consequência, tem-se um decréscimo da tensão superficial com o aumento da temperatura (BRADY e HUMISTON, 1981).

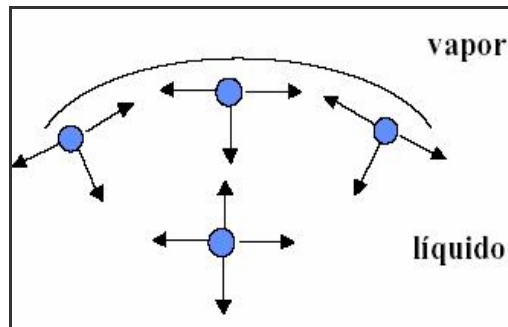


Figura 2.1 - Forças de atração entre moléculas na superfície e no interior de um líquido (SALIN e col., 2003).

As mudanças que ocorrem nas medidas de tensão superficial e interfacial variam de acordo com a concentração do surfactante. Quando há aumento da concentração do surfactante, mais moléculas são adsorvidas na superfície do líquido até um estágio onde não há mais superfície livre para a ação do mesmo. A concentração de surfactante em que ocorre a saturação da superfície, atingindo os menores valores das tensões superficial e interfacial do sistema, é conhecida como Concentração Micelar Crítica (CMC) (DATYNER, 1983).

Com adição de surfactante acima da CMC ocorre associação das moléculas, resultando na formação de supramoléculas como micelas ou vesículas, sem afetar a tensão superficial (Figura 2.2). Desta maneira, mesmo adicionando-se surfactante acima da CMC, as tensões superficial ou interfacial mantêm-se constantes.

As micelas apresentam a característica de serem solúveis em água, tendo um interior hidrofóbico e exterior hidrofílico. A afinidade de compostos hidrofóbicos pelo interior dessas micelas aumenta a aparente solubilidade de compostos como os hidrocarbonetos. A formação das micelas e, conseqüentemente, a propriedade de solubilização dos surfactantes pode ser afetada pela estrutura química do surfactante e por fatores externos como temperatura e pH (DATYNER, 1983).

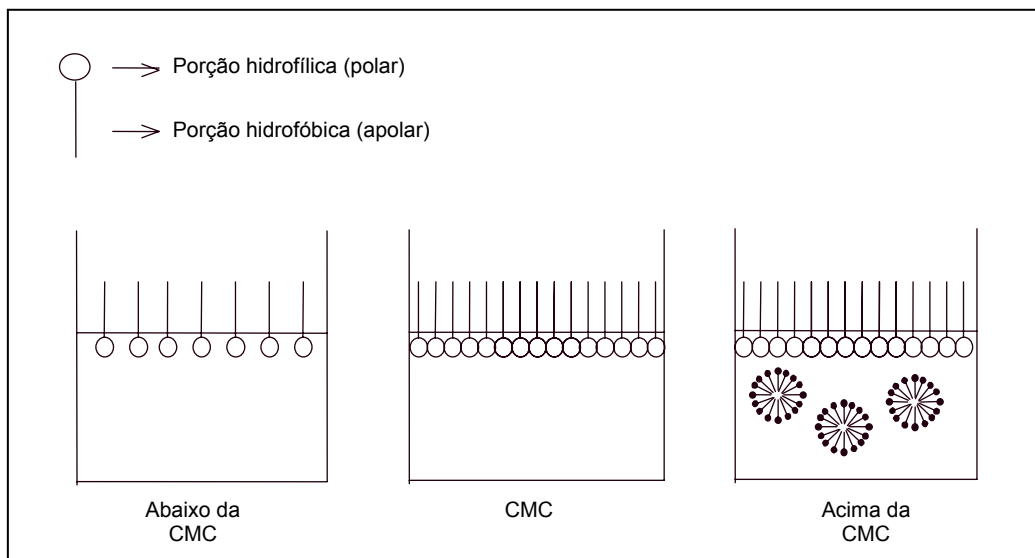


Figura 2.2 – Representação do efeito da variação da concentração do surfactante em solução aquosa.

A presença do surfactante na água destilada propicia a redução da tensão superficial de 72 mN/m a 25 °C para 30 mN/m (DESAI e BANAT, 1997).

Os surfactantes constituem uma importante classe na indústria química, sendo utilizados em vários setores da indústria moderna. Durante as duas últimas décadas, a demanda de surfactantes aumentou, aproximadamente, 300% nas indústrias químicas norte-americanas. A produção mundial excedeu 3 milhões de toneladas por ano (valor aproximado de 4 bilhões de dólares) (BANAT e col., 2000; CAMEOTRA e MAKKAR, 2004). As possibilidades de aplicação deste composto são diversas. Estima-se que 54% são usados nos detergentes; 13% como auxiliares na indústria têxtil e de papel; 10% em processos químicos diversos; 10% em cosméticos e produtos farmacêuticos; 3% na indústria de alimentos; 2% na agricultura e 8% em outras aplicações distintas (RAHMAN e GAKPE, 2008). Destas outras aplicações pode-se destacar a aplicação na biorremediação, favorecendo a remoção/mobilização de óleo, biodegradação, limpeza de tanques de estocagem de óleo e aumento da recuperação do óleo (GEORGIU e col., 1992), além de remediação de ambientes contaminados com metais pesados (MULLIGAN e col., 1999).

A maioria dos surfactantes utilizados é quimicamente sintetizada, tendo o petróleo como matéria-prima (FIECHTER, 1992). Por isto, o uso destes surfactantes no ambiente está sendo questionado porque muitos apresentam alta toxicidade e não são biodegradáveis, permanecendo no ambiente após sua aplicação (RENNER, 1997).

Deste modo, tem sido proposto o uso de surfactantes produzidos por microrganismos – os biossurfactantes, os quais são biodegradáveis e apresentam, relativamente, baixa toxicidade (SCHEIBENBOGEN e col., 1994; BANAT e col., 2000).

2.2 Surfactantes Biológicos – Biossurfactantes

Os biossurfactantes ou surfactantes microbianos apresentam caráter surfactante devido à natureza hidrofóbica/hidrofílica de suas moléculas. Sua porção hidrofílica é constituída por aminoácidos ou peptídios, por mono, di- ou polissacarídeos ou ácidos carboxílicos. A porção hidrofóbica é formada por ácidos graxos saturados ou insaturados (DESAI e BANAT, 1997).

Os biossurfactantes são produzidos por uma variedade de microrganismos, sendo estes um produto extracelular ou fazendo parte da superfície das células. Entre os organismos que produzem biossurfactantes estão incluídos muitas leveduras, bactérias e fungos filamentosos (KOCH e col., 1991).

Os biossurfactantes podem ser agrupados, quanto a sua natureza química, em moléculas de baixa massa molecular, como: os glicolipídeos (trealoselipídeos, ramnolipídeos, soforolipídeos), lipopeptídeos (surfactina, gramicidina S e polimixina), os quais são eficientes na diminuição das tensões superficial e interfacial; e moléculas de maior massa molecular como: polissacarídeos, proteínas, lipoproteínas e biopolímeros, como complexos polissacarídeos-lipídeos, os quais são mais eficientes na estabilidade de emulsões, chamados de bioemulsificantes (Tabela 2.1) (DESAI e BANAT, 1997; ROSENBERG e RON, 1999; BOGNOLO, 1999).

Tabela 2.1 – Principais biossurfactantes e microrganismos produtores (DESAI e BANAT, 1997).

Biossurfactantes	Microrganismos
Glicolipídeos	
Raminolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Trealoselipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Rhodococcus ruber</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Mycobacterium sp.</i>
Soforoselipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>T. apicola</i>
Lipopeptídeos	
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Liquenisina	<i>B. licheniformis</i>
Biossurfactantes Poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Carboidrato-Proteína- Lipídeo	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>Acinetobacter spp</i>

A ação dos biossurfactantes tem sido descrita como sendo a mesma apresentada pelos surfactantes quimicamente sintetizados (FIECHTER, 1992). A concentração micelar crítica (CMC) dos biossurfactantes varia entre 1-2000 mg/L, enquanto que a tensão interfacial (óleo/água) e superficial fica entre 1 a 30 mN/m, respectivamente (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Na Tabela 2.2 são apresentadas as propriedades superficiais, interfaciais e a CMC de alguns biossurfactantes e de surfactantes quimicamente sintetizados.

Tabela 2.2 – Comparação das propriedades superficiais, interfaciais e CMC de biossurfactantes e surfactantes quimicamente sintetizados (CHRISTOFI e IVSHINA, 2002).

Surfactante	Tensão Superficial (mN/m)	Tensão Interfacial (mN/m)	CMC (mg/L)
Complexo de glicolípido de <i>Rhodococcus ruber</i>	26,8	0,9	54
Trealose dicorinomicolato de <i>Rhodococcus erythropolis</i>	36,0	17,0	4
Trealose tetraester de <i>Rhodococcus erythropolis</i>	26,0	< 1,0	15
Raminolípídeos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29,0	0,25	50-200
Soforolípídeos de <i>Torulopsis bombicola</i>	33,0	1,8	82
Surfactina de <i>Bacillus subtilis</i>	27,0	1,0	23
Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	37,0	0,02	2120
Bromato de Cetiltrimetilamonio (CTAB)	30,0	5,0	1300
Tween 20	30,0	4,8	600
Sulfonato de Alquilbenzeno	47,0	<1,0	590

Nota-se a elevada CMC dos surfactante sintéticos comparada as dos biossurfactantes. Isto indica a eficiência do biossurfactante em reduzir as tensões superficiais e interfaciais com menor concentração do produto.

2.2.1 Glicolípídeos

Os biossurfactantes mais conhecidos são os glicolípídeos. Estes compostos são constituídos por carboidratos associados a uma longa cadeia de ácidos alifáticos ou hidroxí-alifáticos (DESAI e BANAT, 1997).

Uma determinada espécie microbiana é capaz de produzir diferentes tipos de glicolípídeos, dependendo da fonte de carbono disponível para seu crescimento. Dentre os glicolípídeos mais conhecidos podem ser citados os raminolípídeos, trealoselípídeos e sofraselípídeos (Figura 2.3) (DESAI e BANAT, 1997).

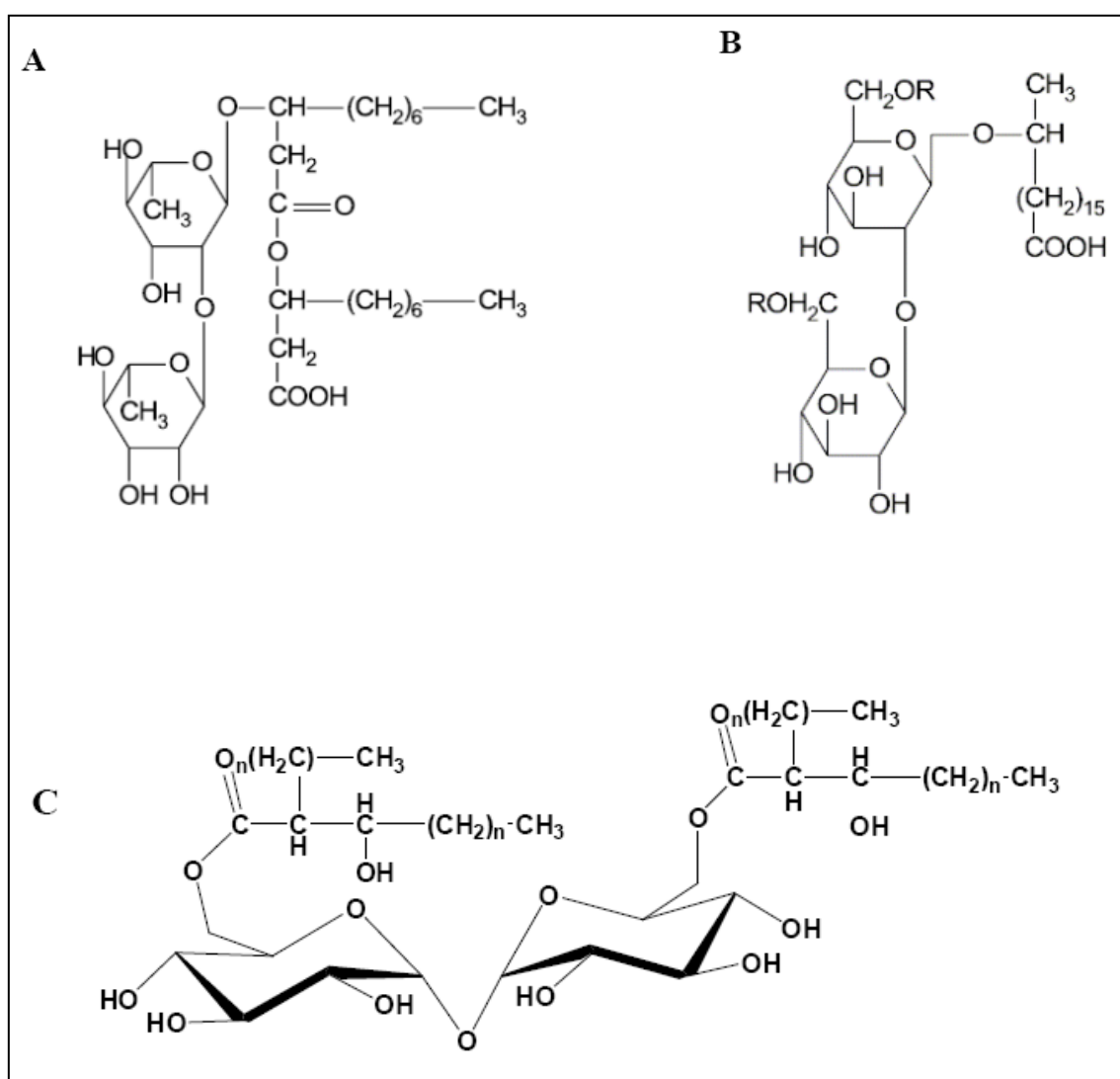


Figura 2.3 – Estrutura molecular dos glicolípídeos. A) Raminolípídeo; B) Soforolípídeo; C) Trealoselípídeo (DESAI e BANAT, 1997).

2.2.2 Ácidos graxos, Lipídeos Neutros e Fosfolipídeos

Normalmente, os ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos são componentes estruturais das células microbianas. Entretanto, algumas bactérias e leveduras excretam grandes quantidades de ácidos graxos e fosfolipídeos com potentes propriedades tensoativas durante o crescimento na presença de n-alcanos (DESAI e BANAT,1997).

2.2.3 Biosurfactantes Poliméricos

Um dos bioemulsificantes poliméricos mais bem estudados é o EMULSAN, produzido pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* RAG1 (Figura 2.4). Este composto apresenta elevado poder emulsificante, mesmo em baixas concentrações, na faixa de 0,01 a 0,1 g/L . O EMULSAN é um heteropolissacarídeo aniônico e proteína, constituído de unidades quimicamente repetidas, formadas por açúcares aminados covalentemente ligados a ácidos graxos através de ligações *o*-ester (DESAI e BANAT, 1997).

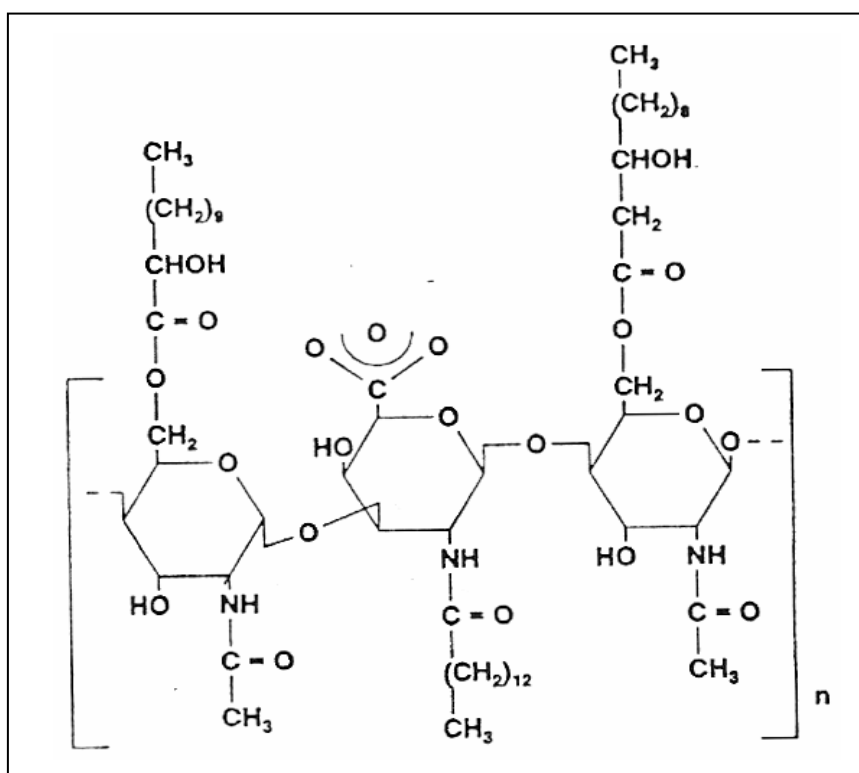


Figura 2.4 – Estrutura molecular do EMULSAN (DESAI e BANAT, 1997).

2.2.4 Lipopeptídios

Um grande número de lipopeptídios com propriedades tensoativas tem sido relatado na literatura (DESAI e BANAT, 1997; FIETCHER, 1992). Estes compostos são sintetizados, principalmente, por bactérias, existindo também alguns relatos de sua obtenção por actinomicetos e leveduras (ZAJIC e SEFFENS, 1984).

A surfactina, um lipopeptídeo produzido por algumas linhagens de *Bacillus subtilis*, é um dos biossurfactantes mais efetivos já conhecidos (Figura 2.5).

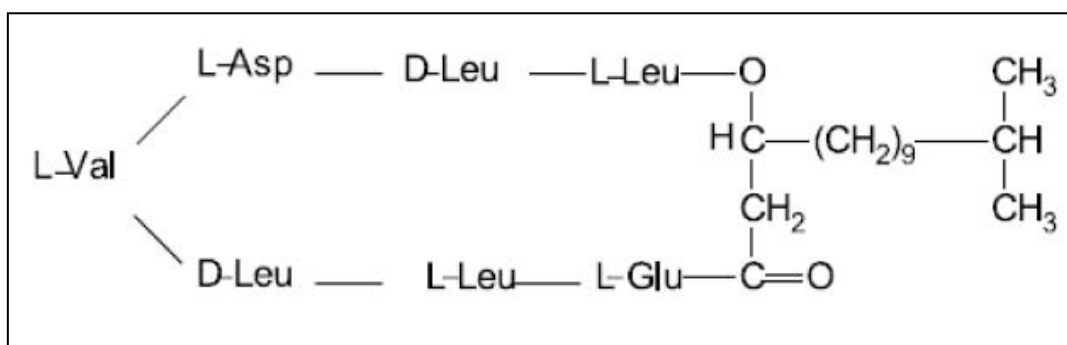


Figura 2.5 – Estrutura molecular da surfactina (DESAI e BANAT, 1997).

2.3 Vantagens e Desvantagens dos Biossurfactantes

Diversas pesquisas mostram que os biossurfactantes apresentam muitas vantagens comparadas aos surfactantes sintéticos. Segundo KOSARIC (2001) e MULLIGAN e WANG (2006), pode-se citar como vantagens dos biossurfactantes:

- Biodegradabilidade: biossurfactantes são facilmente degradados por bactérias e outros microrganismos, não acumulando no ambiente e, conseqüentemente, não causando danos ao mesmo;
- Baixa toxicidade: na maioria das vezes, os biossurfactantes são menos tóxicos que os surfactantes quimicamente sintetizados. KANGA e col.

(1997) relataram que glicolipídeos produzidos por *Rhodococcus* sp 413A foram 50% menos tóxicos que Tween 80 em ensaios de solubilização de naftaleno.

- Biocompatibilidade e digestibilidade: isto garante sua aplicação em cosméticos, produtos farmacêuticos e como aditivos de alimentos funcionais;
- Produção a partir de matéria-prima renovável natural: biossurfactantes podem ser produzidos com matéria-prima natural, disponível em grande quantidade; a fonte de carbono pode ser hidrocarbonetos, carboidratos e/ou lipídeos, que podem ser usados separadamente ou combinados;
- Produção à baixo custo: dependendo do tipo de biossurfactantes, podem ser produzidos com substrato de baixo valor agregado, como resíduos industriais.
- Uso ambiental: biossurfactantes podem ser usados na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos e metais pesados, biodegradação e destoxificação de efluentes industriais, e recuperação de áreas atingidas por derramamento de óleo;
- Especificidade: como os biossurfactantes são formados por moléculas complexas com grupos funcionais específicos possuem atuação específica. Isto é de interesse no uso em cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos, além de destoxificação de poluentes específicos;
- Eficácia: apresentam atuação em condições extremas de pH, salinidade e temperaturas.

Apesar das várias vantagens apontadas para os biossurfactantes, podem-se destacar algumas desvantagens, segundo KOSARIC (1992), como:

- A produção em larga escala é cara. Entretanto, este problema pode ser contornado com o uso de substratos baratos (como resíduos), combatendo ao mesmo tempo a poluição causada por estes, o que

poderia ser um contraponto no balanço dos custos globais do processo;

- Dificuldade em se obter produtos puros, importantes na aplicação em cosméticos, produtos farmacêuticos e alimentos. Isto ocorre devido à complexidade do processo de recuperação deste bioproduto;
- Linhagens superprodutoras são raras e os processos realizados com os microrganismos, estudados até o momento, apresentam baixa produtividade;
- O aumento da produção tem como consequência a formação de grande volume de espuma, impedindo a manutenção do processo. No entanto, KRONEMBERGER e col. (2008) desenvolveram e patentearam um sistema de membranas acoplado a um biorreator que permite a oxigenação do meio de cultivo sem borbulhamento de ar, eliminando a formação de espuma no bioprocessamento.

2.4 Funções Fisiológicas dos Biossurfactantes

A função dos biossurfactantes para a célula produtora ainda não está bem compreendida. Entretanto, há hipóteses considerando diferentes funções para os microrganismos:

- ❖ Emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água: a produção de biossurfactante, possivelmente, seria uma estratégia do microrganismo para sobreviver em ambientes contaminados com substratos hidrofóbicos porque facilitaria o contato e utilização destes substratos como fonte de carbono. WHYTE e col. (1999) verificaram atividade surfactante em células de *Rhodococcus* sp Q15 durante crescimento em hidrocarbonetos e não durante crescimento em glicose. Como a produção de biossurfactante foi verificada durante a fase lag e início da fase exponencial do crescimento, o biossurfactante poderia ser um pré-requisito para a bactéria crescer a partir de hidrocarbonetos. Desta maneira, acredita-se que o tensoativo seria produzido,

predominantemente, durante o crescimento em substrato insolúvel em água, se apresentando como metabólito primário, dependendo do microrganismo. Porém, já foi verificado que cepas de *Bacillus subtilis* produziram surfactante a partir de substratos hidrossolúveis (CIAPINA, 2001) e cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foram capazes de produzir raminolipídeos em substratos hidrofílicos e hidrofóbicos (SANTOS e col., 2002);

- ❖ Transporte de hidrocarbonetos: um aumento significativo da porção lipídica do polissacarídeo de membrana foi detectado quando o microrganismo crescia em alcanos, indicando que o complexo polissacarídeo/ácido graxo presente na superfície celular estaria envolvido no transporte de hidrocarbonetos (NITSCHKE e col., 2002);
- ❖ Aderência-liberação da célula na superfície: possibilitaria a colonização microbiana em nichos ecológicos. Os microrganismos poderiam utilizar surfactantes ligados à parede para regular as propriedades da superfície celular, visando aderir ou se desligar de um determinado local, de acordo com sua necessidade para encontrar novos habitats com maior disponibilidade de nutrientes ou se livrar de ambientes desfavoráveis (NITSCHKE e col., 2002);
- ❖ Atividade antibiótica demonstrada por vários surfactantes da classe dos lipopeptídios e glicopeptídios. Desta forma, o microrganismo produtor teria maior chance de sobrevivência e competição no seu habitat (KOCH e col., 1991; LIN, 1996; WILLUMSEN e col., 1997; NITSCHKE e col., 2002).

2.5 Produção de Biossurfactantes

A eficiência de um bioprocessamento é a base para qualquer indústria biotecnológica, incluindo aquela voltada para a produção de biossurfactantes. Neste caso, a busca pelo aumento da produtividade demanda a adição de componentes ao meio de cultura que induzirão a máxima ou ótima produtividade. De um modo similar, eficientes técnicas e metodologias são

necessárias para a recuperação máxima do produto (MUKHERJEE e col., 2006).

Dentre os vários fatores que influenciam o tipo e quantidade de surfactante biológico produzido, podem ser citados: o microrganismo, a fonte de carbono, as possíveis exigências nutricionais, e as condições de cultivo como aeração, agitação, temperatura e pH (GUERRA - SANTOS e col., 1986, MULLIGAN, e col., 1989; DESAI e BANAT, 1997).

A fonte de carbono é um fator importante no processo de síntese de biosurfactante, uma vez que a alteração do substrato geralmente resulta em modificação da sua estrutura química, ocasionando variação das suas propriedades físico-químicas.

Alguns microrganismos somente produzem compostos tensoativos quando cultivados em fontes de carbono hidrofóbicas. Entretanto, os biosurfactantes podem ser produzidos a partir de substratos simples e solúveis em água. Tal fato tem relevância, considerando que fermentações com substratos solúveis são mais facilmente conduzidas do que com hidrocarbonetos.

Nutrientes como nitrogênio, fósforo e ferro podem alterar a produtividade do processo, uma vez que são indispensáveis para o metabolismo microbiano (GUERRA - SANTOS e col., 1986; WEI e CHU, 1998). A concentração, o tipo de fonte nutricional e como eles são adicionados na fermentação, levam ao incremento ou decréscimo da produção.

As condições de cultivo como temperatura, pH e oxigenação também afetam acentuadamente a produção do surfactante, pois estes parâmetros interferem nas velocidades das reações enzimáticas, ou seja, estão diretamente relacionadas à atividade metabólica dos microrganismos (DESAI e BANAT, 1997).

Por meio do estudo da cinética de produção do biosurfactante, definindo-se modelos de produção associada ou não associada ao crescimento, é possível estabelecer parâmetros relacionados ao consumo de substrato, crescimento microbiano e formação de produto que apontarão

alternativas para o modo de condução do processo partindo de sistemas de batelada simples, batelada alimentada ou processos contínuos.

Desta forma, modelos para a produção de biossurfactantes por diferentes espécies microbianas e o desenvolvimento do processo de produção devem ser otimizados caso a caso (LIN, 1996).

Podem-se destacar alguns trabalhos realizados, visando a busca de melhores condições de cultivo, com substratos economicamente viáveis, para aumentar a produção de biossurfactantes produzidos por diferentes microrganismos.

KIM e col. (1997), trabalhando com *Bacillus subtilis*, obtiveram melhor produção do biossurfactante (7,0 g/L) utilizando glicose, sal de amônio, fosfato e sulfato de manganês. Os autores verificaram a inibição da produção em substratos insolúveis como hidrocarboneto.

WEI e CHU (1998) obtiveram aumento da produção do tensoativo (3,5 g/L) produzido por *Bacillus subtilis* alterando a concentração de ferro e manganês no meio de cultura.

DAVIS e col. (1999) demonstraram a relação do aumento da produção de surfactina com a concentração de nitrogênio. A maior produção alcançada foi de 0,439 g/L do biossurfactante em condição anaeróbia e limitada de nitrato.

Para reduzir custo na produção do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*, FOX e BALA (2000) avaliaram o uso de substrato a base de batatas. O estudo indicou que a bactéria foi capaz de utilizar batata para produzir o surfactante.

WEI e col. (2003) obtiveram produção de 3,5 g/L de surfactina com crescimento de *Bacillus subtilis* em glicose suplementada com ferro. Neste trabalho, verificaram também que o excesso de ferro acidificou o meio, diminuindo a produção do biossurfactante.

NITSCHKE e PASTORE (2004) obtiveram uma concentração de 3,0 g/L de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*, utilizando-se como substrato o efluente do processamento de manipueira.

REIS e col. (2004) verificaram a produção de compostos tensoativos por *Bacillus subtilis*, avaliando a influência de algumas condições de cultivo a fim de maximizar a sua produção e, assim, torná-los competitivos com os surfactantes sintéticos comercializados. A produção de biossurfactante foi maior em meio de cultura contendo açúcar cristal como fonte de carbono, microssais e EDTA, alta concentração de NaCl e pH ajustado em 7 e 8.

MULLIGAN e col. (1989), trabalhando com *Pseudomonas aeruginosa*, observaram aumento da produção de ramnolipídeos quando o nitrogênio tornou-se limitante para o crescimento bacteriano.

BABU e col. (1996) estudaram a cinética de produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* em meio sintético e efluente industrial. Em meio sintético a produção do biossurfactante foi associada ao crescimento e, no efluente, a produção iniciou-se mais tarde, na fase estacionária do crescimento, caracterizando-se como uma produção não associada ao crescimento, sendo este um metabólito secundário. A produção do biossurfactante foi verificada quando a fonte de nitrogênio se exauriu e a concentração do produto obtida foi de 1,85 g/L.

BENINCASA e col. (2002) avaliaram diferentes substratos para verificar a produção de biossurfactante de *Pseudomonas aeruginosa* e obtiveram concentração de 16 g/L de ramnolipídio em 54h de cultivo em biorreator, utilizando-se resíduos de óleos vegetais como único substrato.

SANTA ANNA e col. (2002) estudaram a produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em diferentes fontes de carbono como n-hexadecano, óleo parafínico, glicerol e óleo de babaçu. A melhor fonte de carbono foi o glicerol, pois o biossurfactante produzido promoveu a redução da tensão superficial para 27,46 mN/m. Em seguida, foi verificada a influência da concentração de glicerol na produção do biossurfactante. A melhor produção foi alcançada com 3% de glicerol ($Y_{P/S} = 0,13$ g/g; $Y_{P/X} = 0,70$ g/g) correspondendo a uma razão C/N de 60/1. Com 6% de glicerol foi verificada inibição da produção. O efeito da fonte de nitrogênio (sulfato de amônio e nitrato de sódio) foi avaliado e a melhor produção foi obtida com nitrato de sódio ($Y_{P/X} = 0,8$ g/g). Desta forma, houve aumento da produção de surfactante, alcançando 7,5 g/L utilizando-se glicerol e nitrato de sódio.

SANTOS e col. (2002) verificaram a produção de raminolípídeos por esta cepa, utilizando diferentes fontes de carbono e nitrogênio e variadas relações C/N. Observaram que a utilização de nitrato de sódio como fonte de nitrogênio e glicerol como fonte de carbono, sob diferentes relações C/N, levou a uma maior produtividade, em comparação com a utilização de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Este resultado sugere que a limitação de nitrogênio levou ao aumento da produtividade do bioprocessamento, uma vez que a assimilação de nitrato como fonte de nitrogênio é mais lenta que a assimilação de íons amônio. Em 2005, SANTA ANNA continuou os estudos com a condução do bioprocessamento em batelada alimentada de nitrogênio, com excesso de fonte de carbono e conseguiu aumentar a produção para 13,2 g/L de raminolípídeos.

Nos trabalhos de revisão de MANEERAT (2005) e MUTHUSAMY e col. (2008), os autores citaram alguns estudos nos quais verificaram a produção de biossurfactante por *Pseudomonas* spp, *Bacillus subtilis*, *Candida* sp e *Acinetobacter* sp em matérias-primas de baixo valor agregado. A Tabela 2.3 mostra um resumo da produção de surfactantes por estes microrganismos.

Tabela 2.3 - Produção de biossurfactantes por diferentes microrganismos em substrato de baixo valor agregado (MANEERAT, 2005 e MUTHUSAMY e col., 2008).

Matéria-prima ou resíduo	Biossurfactante	Microrganismo	Produção (g/L)
Óleo de babaçu	Soforolípídeo	<i>Candida lipolytica</i> IA 1055	11,72
Óleo de girassol e óleo de soja	Raminolípídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS10-129	4,31
Manipueira	Lipopeptídeo	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 e LB5a	2,2
Óleo de soja	Lípídeo manosileritritol	<i>Candida</i> sp SY 16	95,0
Resíduo de refinaria	Glicolípídeo	<i>Candida antarctica</i> , <i>Candida apicola</i>	10,5
Efluente de processamento de batatas	Lipopeptídeo	<i>Bacillus subtilis</i>	2,7
Resíduo do processamento de óleo vegetal	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	25,0
Resíduo do processamento de óleo vegetal	Raminolípídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	15,9

2.6 Recuperação dos Biossurfactantes

O processo ideal de recuperação do produto deve ser rápido, eficiente e de baixo custo. Mesmo que uma elevada produção de biossurfactante seja alcançada em condições otimizadas, o processo de produção estará incompleto sem um eficiente e econômico método para recuperar o produto (MUTHUSAMY e col., 2008).

A metodologia utilizada para recuperação do biossurfactante depende, prioritariamente, da natureza química da biomolécula.

As técnicas mais utilizadas para recuperação do tensoativo do meio de cultura são as extrações com solventes, precipitação ácida, cristalização, precipitação com sulfato de amônio, etanol ou acetona com posterior centrifugação, separação da espuma, adsorção-desorção em resinas, ultrafiltração (Tabela 2.4) (MULLIGAN e col., 1989; DESAI e BANAT, 1997; MULLIGAN e col., 2001a; KUYUKINA e col., 2001; KUMAR e col., 2004).

Tabela 2.4 - Métodos de separação dos biossurfactantes e suas vantagens. Adaptado de DESAI e BANAT (1997) e MUTHUSAMY e col. (2008).

Método de recuperação	Propriedade do biossurfactante	Vantagens da técnica
Precipitação ácida	Biossurfactantes tornam-se insolúveis em baixos valores de pH (raminolípídeos e surfactina).	Baixo custo; recuperação do biossurfactante bruto.
Extração com solventes orgânicos	Biossurfactantes são solúveis em solventes orgânicos devido sua porção hidrofóbica (glicolípídeos)	Recuperação do biossurfactante bruto; purificação parcial e possibilidade de reuso.
Precipitação com sulfato de amônio ou etanol	Biossurfactante com alto teor de proteínas ou poliméricos (bioemulsificantes como polissacarídeos).	Eficiente para alguns tipos de biossurfactantes poliméricos. Possibilidade de reuso do etanol.
Separação da espuma	Biossurfactantes que formam e permanecem na espuma (surfactina)	Recuperação contínua durante processo de produção; alta pureza do biossurfactante
Ultrafiltração em membrana	Biossurfactantes formam micelas acima da CMC, as quais são retidas na membrana (glicolípídeos)	Rápido; alta pureza do biossurfactante

Normalmente, um único procedimento para recuperar e purificar o biossurfactante não é suficiente. Em muitos casos, é elaborada uma estratégia de múltiplos passos para que a recuperação seja mais eficiente (MUTHUSAMY e col., 2008). Por essas razões, o processo de recuperação de produtos biotecnológicos pode ter um custo correspondente de, aproximadamente, 60% do custo total do bioprocessamento (DESAI e BANAT, 1997).

2.7 Biossurfactantes versus Surfactantes

Os biossurfactantes devem competir com os surfactantes de origem petroquímica nos aspectos de custo de produção e sua funcionalidade nas diversas áreas de aplicação.

A aplicação comercial do biossurfactante tem sido limitada devido ao custo de produção mais elevado que os surfactantes quimicamente sintetizados. Na Tabela 2.5 está apresentado o custo de produção de alguns surfactantes. Apesar de ser uma referência antiga nota-se o custo mais elevado para produção dos biossurfactantes. No caso do trealoselipídeo, o valor é ainda maior, pois se trata de um biossurfactante que permanece aderido à parede celular, necessitando de tratamento para sua liberação. Dados mais atualizados de custo de produção não foram encontrados.

Tabela 2.5 - Custo do biossurfactante e do surfactante (KOSARIC e col.,1994).

Surfactante	U\$/Kg
Trealoselipídeo de <i>Rhodococcus erythropolis</i>	18,8
Ramnolipídeo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9,1
SDS (surfactante sintético)	1,5

Para a redução dos custos na produção de biossurfactantes, os estudos devem focar a seleção de microrganismos potencialmente produtores e a otimização do processo de produção, maximizando o rendimento e

produtividade do processo, optando-se por substratos econômicos, renováveis, que garantam o máximo crescimento microbiano.

Uma variedade de subprodutos tem sido utilizada como substrato na produção de muitos metabólitos microbianos. A disponibilidade e o tipo de matéria-prima podem contribuir consideravelmente para o custo de produção. Estima-se que 10 a 30% da matéria-prima representam o custo total de um produto biotecnológico (MUKHERJEE e col., 2006).

Os resíduos industriais têm despertado grande interesse dos pesquisadores como alternativa para o fornecimento de substratos de baixo custo para a produção de biossurfactantes. Muitos biossurfactantes têm sido produzidos a partir de substratos agroindustriais renováveis e de baixo custo. Efluentes domésticos, óleos vegetais, resíduos de fritura de óleos vegetais, resíduos de destilaria de óleos, resíduos da indústria de laticínios (soro do leite), melão de cana e glicerina têm sido citados na literatura (KOSARIC e col. 1984; GHURYE e col., 1994; MERCADE e MANRESA, 1994; BABU e col., 1996; MAKKAR e CAMEOTRA, 2002; BENINCASA e col., 2002; SANTOS e col., 2002; NITSCHKE e col., 2004, REIS e col., 2004; MANEERAT, 2005; MARIANO e col., 2008). Nestes casos, há ainda o benefício ao meio ambiente pela redução da carga de material poluente.

Recentemente, BARROS e col. (2007) descreveram a importância da variedade de resíduos industriais como matéria-prima para diversos bioprocessos. Segundo os autores, a utilização de resíduos agroindustriais para produção de biossurfactantes é um dos passos para viabilização e implantação desses processos em escala industrial.

Um custo mais elevado de produção pode ser tolerado quando esta biomolécula for utilizada em pequena quantidade (cosméticos e produtos medicinais), mas isto não se aplica quando utilizado em tecnologia ambiental e na indústria do petróleo que, em geral, requerem grandes volumes de solução surfactante.

No que diz respeito à funcionalidade, os biossurfactantes estão sendo estudados quanto a sua ação e estabilidade em diversas áreas de aplicação

(SINGH e col., 2007; KUTHUSAMY e col., 2008; RAHMAN e col., 2008). Os resultados mostram boa estabilidade da molécula proporcionando credibilidade ao produto.

Apesar das barreiras econômicas para produção do biossurfactante, o surfactante quimicamente sintetizado tem o petróleo como matéria-prima. Este é um bem com custo variável e passível de esgotamento, necessitando assim de tecnologias alternativas para a produção comercial dos outros tensoativos (KOSARIC e col., 1984).

2.8 Aplicações dos Biossurfactantes

➤ Remoção e Biodegradação de Hidrocarbonetos no Ambiente

Os surfactantes podem ser empregados em técnicas de remediação 'in situ' de áreas contaminadas com hidrocarbonetos e organoclorados. Dentre elas estão a lavagem de solo ("soil fluxing") e a biorremediação (SPILBORGHS, 1997).

A lavagem de solo pela injeção de soluções de surfactante pode promover e acelerar os processos de lixiviação no solo. A maior vantagem do uso de soluções aquosas de surfactante é seu poder de penetração nas zonas contaminadas, promovendo a aparente solubilidade dos compostos adsorvidos. O óleo em contato com a solução de surfactante é disperso e solubilizado em micelas de surfactante. Assim, o óleo adsorvido nos poros da matriz de solo é removido pelo fluxo de água. Isto favorece as lavagens, aumentando a remoção do poluente pelo bombeamento da água subterrânea (SCHEIBENBOGEN e col., 1994).

A adição de surfactantes também tem sido sugerida no processo de biorremediação de solos e aquíferos que utiliza os microrganismos naturais ou adaptados de um local para biodegradar os contaminantes do meio ambiente, minimizando os riscos para a saúde pública e meio ambiente (EPA, 1990).

A biorremediação de locais contaminados pode ser dificultada se os contaminantes estiverem adsorvidos na matriz do solo ou não dissolvidos em água.

A aplicação do surfactante é indicada para solubilizar e aumentar a disponibilidade do poluente para a degradação microbiana (FALATKO e col., 1992; WILLUMSEN e col., 1997).

BARTHA (1986) estimou que aproximadamente 0,08 – 0,4 % do total da produção mundial de petróleo alcança os oceanos. Exemplo bem conhecido refere-se ao derramamento de óleo do Exxon Valdez na Prince William Sound em 1989 (HARVEY e col., 1990). No Brasil, apenas no ano de 2000, podem ser citados os acidentes provocados pelas Refinarias de Petróleo da Petrobrás, que danificaram parte dos manguezais da Baía da Guanabara, Rio de Janeiro, com 1,3 milhões de litros de óleo combustível e, meses após, a mesma empresa foi responsável pelo maior vazamento do produto no Rio Iguaçu, Paraná, com 4 milhões de litros de óleo cru derramados.

Embora ocorra a biodegradação destes hidrocarbonetos por populações microbianas do próprio ambiente marinho, a aplicação conjunta do biossurfactante poderia favorecer o aumento da remoção deste hidrocarboneto (BANAT e col., 2000). Segundo KOSARIC (2001), na maior parte das vezes, o uso de surfactantes na biodegradação encurta o tempo de degradação e, especialmente, o tempo de adaptação do microrganismo na condição adversa em que se encontra.

Resultados variáveis são encontrados referentes à utilização de biossurfactantes na remoção e biodegradação de poluentes.

ODERBREMER e col. (1990), estudando a degradação de hidrocarbonetos em solo, obtiveram um aumento significativo na degradação quando sofrolipídeos foram adicionados em um sistema contendo 10% de solo e 1,35% de uma mistura de hidrocarbonetos (tetradecano, pentadecano, hexadecano, fenildecano, naftaleno) em meio mineral. Na ausência do surfactante, 81% desta mistura foi degradadas em 114 horas, enquanto que, na presença do biossurfactante mais de 90% foi degradada em 79 horas.

HARVEY e col. (1990) testaram um biossurfactante de *P. aeruginosa* quanto à sua habilidade de remover óleo de amostras de pedras e cascalhos contaminados sob várias condições, assim como diferentes concentrações de

biossurfactante, tempo de contato e temperatura de lavagem. Os autores encontraram um aumento da dispersão do óleo de 2-3 vezes maior em comparação a água pura. O tempo de contato necessário para o máximo efeito foi também reduzido de 1,5 – 2 minutos com água pura para 1 minuto.

Em estudo de laboratório, JAIN e col. (1992) compararam o efeito da adição de células de *P. aeruginosa* UG2 e do biossurfactante produzido por estes microrganismos na biodegradação de uma mistura de hidrocarbonetos em solo durante o período de 2 meses de incubação. A adição do biossurfactante aumentou significativamente a degradação de tetradecano, hexadecano e pristano, mas não do 2-metilnaftaleno, o mais solúvel destes hidrocarbonetos. A adição das células UG2 teve um efeito significativo na biodegradação desses hidrocarbonetos.

FALATKO e NOVAK (1992) estudaram a remoção de gasolina em coluna de areia na presença de biossurfactante e foi observado um aumento de mais de 15 vezes na concentração dos compostos da gasolina no efluente de lavagem.

No trabalho sobre a produção de biossurfactante por bactérias que secretaram o tensoativo na presença de naftaleno e fenantreno como única fonte de carbono, DÉZIEL e col. (1996) detectaram um biossurfactante que foi responsável pelo aumento na concentração de fenantreno em fase aquosa. Isto indicou uma função potencial do biossurfactante em aumentar a solubilidade desses compostos.

IVSHINA e col. (1998) verificaram a produção de biossurfactantes por diversas cepas de *Rhodococcus* sp., em n-alcanos, bem como sua habilidade em remover óleo associado a solos contaminados. *R. ruber* mostrou ser uma espécie promissora, que produziu surfactante de baixa toxicidade, efetivo na remoção de óleo de superfícies, chegando a 99,2% de remoção utilizando-se 2g/L de surfactante.

RAHMAN e col. (2002) estudaram o processo de biodegradação de n-alcanos em borras de petróleo. Os autores obtiveram 100% de degradação das frações de hidrocarbonetos na faixa de C8-C11; 83 - 98% de C12-C21; 80 –

85% de C22-C31 e 57 – 78% de C32-C40, com a adição de um consórcio microbiano, nutrientes e raminolipídeos.

URUM e col. (2003) avaliaram as condições ótimas para a lavagem de solos contaminados com óleo utilizando soluções de vários biossurfactantes, tendo sido avaliadas as influências de diferentes variáveis sobre a remoção de óleo, sendo elas a temperatura de lavagem, o volume e a concentração da solução de biossurfactante, a velocidade de agitação e o tempo de lavagem. Resultados mostraram que a temperatura e a concentração da solução de surfactante foram os parâmetros que mais influenciaram sobre a remoção de óleo. A máxima remoção de óleo observada para raminolipídeos e saponina foi em torno de 80%. Por apresentarem baixa toxicidade e fácil biodegradabilidade, obtiveram preferência sobre o SDS, o qual apresentou 95% de remoção, mas trata-se de um surfactante químico extremamente tóxico.

KUYUKINA e col. (2005) compararam a capacidade de remoção de óleo de solos contaminados por biossurfactantes produzidos por *Rhodococcus ruber* e pelo surfactante comercial Tween 60. O biossurfactante apresentou capacidade de remoção 1,4 - 2,3 vezes maior que o surfactante comercial. O aumento da mobilização de óleo promovida pelo biossurfactante estava diretamente relacionado com a temperatura, sendo mais lenta a 15°C que a 22 – 28°C. Um modelo matemático construído para simular o processo de penetração do óleo através do solo indicou uma forte correlação entre a penetração do surfactante através do solo contaminado e a remoção de óleo. Biossurfactantes foram menos adsorvidos pelos componentes do solo que os surfactantes sintéticos, penetrando, deste modo, rapidamente através do solo e removendo 65 – 82% do óleo.

URUM e col. (2006) compararam a eficiência de raminolipídeos, saponina e SDS na remoção de óleo de solos contaminados. A eficiência dos surfactantes foi quantificada e, posteriormente, a análise por GC/MS foi conduzida para investigar a distribuição de hidrocarbonetos remanescentes da lavagem. Os resultados mostraram que SDS removeu a maior parte do óleo,

seguido de raminolípido e saponina. A análise por GC/MS indicou que os diferentes surfactantes apresentaram preferências quanto aos componentes do óleo que removeram do solo. SDS removeu mais hidrocarbonetos alifáticos que aromáticos, enquanto saponina removeu, preferencialmente, os hidrocarbonetos aromáticos. Desta forma, estes dados forneceram importantes informações para a seleção de surfactantes a serem utilizados para a remoção de óleo de solos contaminados.

SHIN e col. (2006) estudaram a utilização de biossurfactantes para remediar solos contaminados com fenantreno pela combinação dos processos de solubilização e biodegradação. Nos experimentos para avaliar a solubilização, observou-se que 150 mg/L de raminolípidos produzidos por *Sphingomonas* sp. permitiram um percentual de remoção de fenantreno de 17,3% e 9,5% em pH 5 e 7, respectivamente. Posteriormente, as amostras de solo foram monitoradas por 10 dias para o acompanhamento da degradação do fenantreno. A concentração de fenantreno nas amostras de solo decresceu significativamente durante a etapa de biodegradação, com exceção dos experimentos conduzidos a pH 4. O percentual de remoção do fenantreno alcançado com as duas técnicas combinadas chegou a 44% em pH 6. Estes resultados sugerem a eficiência de uma ação combinada das técnicas de solubilização e biodegradação para aumentar a eficiência de remoção deste contaminante.

BENINCASA (2007) estudou a biodegradação de hidrocarbonetos em solo com o uso de 1 mg de biossurfactante de *P. aeruginosa* por grama de solo. Obtiveram uma degradação de 85% em 20 dias de experimento em microcosmo.

SANTA ANNA e col. (2007) investigaram a utilização de biossurfactantes do tipo raminolípido na remoção de dois tipos de óleo de solos contaminados. Em solos contendo predominantemente hidrocarbonetos parafínicos ou aromáticos, o percentual de remoção de óleo atingiu 91 e 78%, respectivamente, na presença de meios de cultivo com concentrações de raminolípidos de 6,3 a 7,9 g/L.

A cepa de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277, utilizada nesta tese, produziu um surfactante em condição de cultivo não otimizada e, para investigar a eficiência deste biosurfactante produzido, experimentos preliminares foram realizados utilizando o meio fermentado contendo o surfactante para a remoção de hidrocarbonetos de borras oleosas. Foi verificada uma remoção de até 94% deste composto, confirmando o potencial deste biosurfactante para a recuperação de óleo e remediação de áreas contaminadas (MELO, 2005; CIAPINA e col., 2006). Em trabalho posterior, PACHECO (2008) realizou ensaios de lavagem de sedimentos arenosos com o biosurfactante bruto, extraído do meio fermentado, produzido pela mesma cepa de *Rhodococcus erythropolis* em condição de cultivo variada. Os resultados demonstraram a habilidade em remover óleo de solos contaminados. Em casos de remoção imediatamente após a impactação do sedimento, concentrações duas vezes abaixo da CMC, já foram capazes de remover 97% do óleo. Nos ensaios de lavagem do sedimento arenoso após 1 mês de contaminação observou-se que concentrações crescentes de biosurfactantes presentes em solução aquosa permitiram percentuais mais altos de remoção de óleo da areia, chegando a 97,6 e 99% quando utilizadas concentrações duas e quatro vezes a CMC, respectivamente. Após 2 meses de contaminação, entretanto, a eficiência de remoção foi significativamente menor, sugerindo que a perda de componentes voláteis e hidrocarbonetos de menor massa molecular tenha levado ao aumento da densidade e da viscosidade, com uma maior adsorção do óleo ao solo.

➤ Remoção de Metais Pesados

Ambientes aquáticos e terrestres podem ser contaminados com metais pesados como resultado de inúmeras atividades industriais, incluindo mineração, produção de baterias, emissão de gases por veículos, além de efluentes industriais (HONG e col., 2002). A presença de metais pesados no ambiente causa sérios problemas porque eles não são biodegradados. Os metais pesados podem ficar adsorvidos no solo, atingir rios e lagoas ou ainda,

percolar o solo contaminando a água subterrânea. Plantas, animais e humanos podem ser contaminados por meio da ingestão de águas e alimentos contaminados. Cádmio, chumbo, cromo, cobre, ferro, mercúrio, níquel e zinco são considerados os mais prejudiciais e estão incluídos na lista da EPA como poluentes prioritários no processo de descontaminação ambiental (MULLIGAN e col., 2001a, SENTHILKUMAAR, 2000).

O aumento do problema de contaminação por metais estimula a busca por novas tecnologias para remoção destes poluentes. O processo de biossorção é apontado como tecnologia alternativa para a solução do problema de contaminação (VIEIRA e VOLEKY, 2000; GOYAL e col., 2003). Biossorção é um processo de remoção de metais por material biológico, assim como biomassa e metabólitos. As principais vantagens da biossorção são alta seletividade e eficiência (MOON e col, 2005).

MULLIGAN e col. (1999) demonstraram o uso de biossurfactante na remoção de metais de solo e sedimentos. Surfactina de *Bacillus subtilis* foi utilizada em solo contaminado com 420 mg/kg de cobre. Uma série de cinco lavagens removeu 70% do cobre com 1% de surfactina em 1% NaOH. Posteriormente, MULLIGAN e col. (2001a) testaram este surfactante no tratamento de sedimentos contaminados com cobre e zinco, mas apresentou menor eficiência, sendo que, com uma simples lavagem, obtiveram uma remoção de 15% de cobre e 6% de zinco com surfactina.

LOAËC e col. (1997), trabalhando com EPS produzido pela bactéria *Alteromonas macleodii* subespécie *fijiensis*, verificaram forte ligação do EPS com diferentes metais obtendo uma capacidade máxima de biossorção de 316 mg Pb(II)/g EPS, 125 mg Cd/g EPS e 75 mg Zn/g EPS. Segundo os autores, estes resultados indicam o potencial de aplicação do polissacarídeo na biodetoxificação de água contaminada.

Trabalhos reportados por NEILSON e col. (2003) e MULLIGAN e WANG (2004) apontam a atividade de raminolipídeos na remoção de metais pesados, como Ni e Cd do solo, com eficiência de 80-100% em laboratório e 20-80% no campo.

MOON e col. (2005) destacaram o uso de biopolímeros, como polissacarídeo microbiano extracelular (EPS), como melhor bioissorvente devido suas propriedades de troca iônica, excelente seletividade para certos metais e baixo custo de produção. Esses autores obtiveram como resultado uma capacidade de bioissorção do EPS de 120 mg Pb (II)/g EPS e 60 mg Zn/g EPS.

➤ Limpeza de Reservatórios de Óleos

Resíduos e frações de óleos pesados que sedimentam no fundo de tanques de estocagem são altamente viscosos e podem se tornar depósitos sólidos que não são removidos através de bombeamento convencional. A remoção requer lavagens com solventes ou limpeza manual, ambas perigosas, demoradas e caras. Um processo alternativo de limpeza é o uso de surfactante, promovendo a diminuição na viscosidade e a formação de emulsão, facilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru após quebra da emulsão (BANAT e col., 2000).

➤ Recuperação Melhorada do Petróleo (MEOR)

A MEOR consiste em uma tecnologia de recuperação terciária do petróleo que utiliza microrganismos ou produtos de seu metabolismo para a recuperação de óleo residual (BANAT, 1995). A diminuição da tensão superficial óleo-rocha, por meio de uso de surfactantes, reduz as forças capilares que impedem a movimentação do óleo através dos poros da rocha. A utilização de biosurfactantes em MEOR envolve várias estratégias, como a injeção de microrganismos produtores de biosurfactante no reservatório e subsequente propagação *in situ*; ou a injeção de nutrientes no reservatório, estimulando o crescimento de microrganismos produtores; ou ainda, produção de biosurfactante em reatores e posterior injeção no reservatório (BANAT e col., 2000).

➤ Outras aplicações

Agricultura: os surfactantes podem ser aplicados na agricultura em formulações de pesticidas e herbicidas, uma vez que estes compostos possuem princípios ativos insolúveis em água (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Terapêutica: o uso de biossurfactantes na área medicinal tem aumentado na última década devido suas comprovadas atividades antibacterianas e antifúngicas; atividade antiviral e antitumoral. Estudos sugerem sua atividade como agentes antiadesivos para uso em cateteres visando diminuir a formação de biofilmes (RODRIGUES e col., 2006). A surfactina possui várias aplicações farmacêuticas como inibição de coágulos e formação de canais iônicos nas membranas (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Produtos de higiene e cosméticos: surfactantes são compatíveis com a pele, podendo ser utilizados em hidratantes para pele e cabelo, batons, entre outros (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Indústria de alimentos: importante na formação da consistência e textura, bem como na solubilização de aromas e emulsificação, no processamento de matérias-primas (NITSCHKE e PASTORE, 2002; FREIRE e col., no prelo)

Produção de etanol a partir de biomassas: lignocelulose é um substrato em potencial para produção de etanol. Entretanto, açúcares constituintes deste substrato não estão disponíveis para conversão em etanol. Assim, a hidrólise enzimática para conversão da celulose em açúcar solúvel tem sido estudada. Entretanto, altas conversões requerem altas concentrações de enzima, o que torna o processo de baixa viabilidade. Estudos mostram que a adição de surfactante pode diminuir em até 50% a carga de enzima necessária na hidrólise enzimática (ERIKSSON e col., 2002; ALKASRAWI e col., 2003).

Outras aplicações estão ligadas à indústria têxtil, garantindo maior molhabilidade; indústria de tintas, possibilitando melhor espalhamento das misturas; além de espumas na fabricação de extintores de incêndio.

Na Tabela 2.6 estão apresentadas, de forma condensada, as diversas aplicações dos biossurfactantes.

Tabela 2.6 – Aplicações dos surfactantes em diversos setores industriais (SINGH e col., 2007).

Indústria	Aplicação	Função
Petróleo	Limpeza de reservatórios de óleo; aumento da recuperação de petróleo	Reduzir a viscosidade e formar emulsões, facilitando a remoção de óleos pesados depositados em fundos de reservatórios; reduzir as forças capilares estimulando a liberação de óleo através dos poros da rocha.
Ambiental	Biorremediação: remediação de águas e solos	Emulsificação e remoção de hidrocarbonetos; remoção de metais; agente espumante; detergente; dispersante, lavagem de solo.
Alimentícia	Emulsificação	emulsionar, favorecendo a consistência e a textura; interação com lipídeos, proteínas e carboidratos; agente protetor.
Agrícola	Emulsificação	Emulsionar pesticidas e herbicidas, facilitando a dispersão do composto ativo.
Cosmética	Produtos de higiene e beleza	Emulsificantes; umectantes; espumantes, solubilizantes; mediadores da ação enzimática.
Farmacêutica	Produtos terapêuticos	Inibir formação de coágulos; atividade antibacteriana e antifúngica; vacinas.

2.9 Bactérias do Gênero *Rhodococcus*

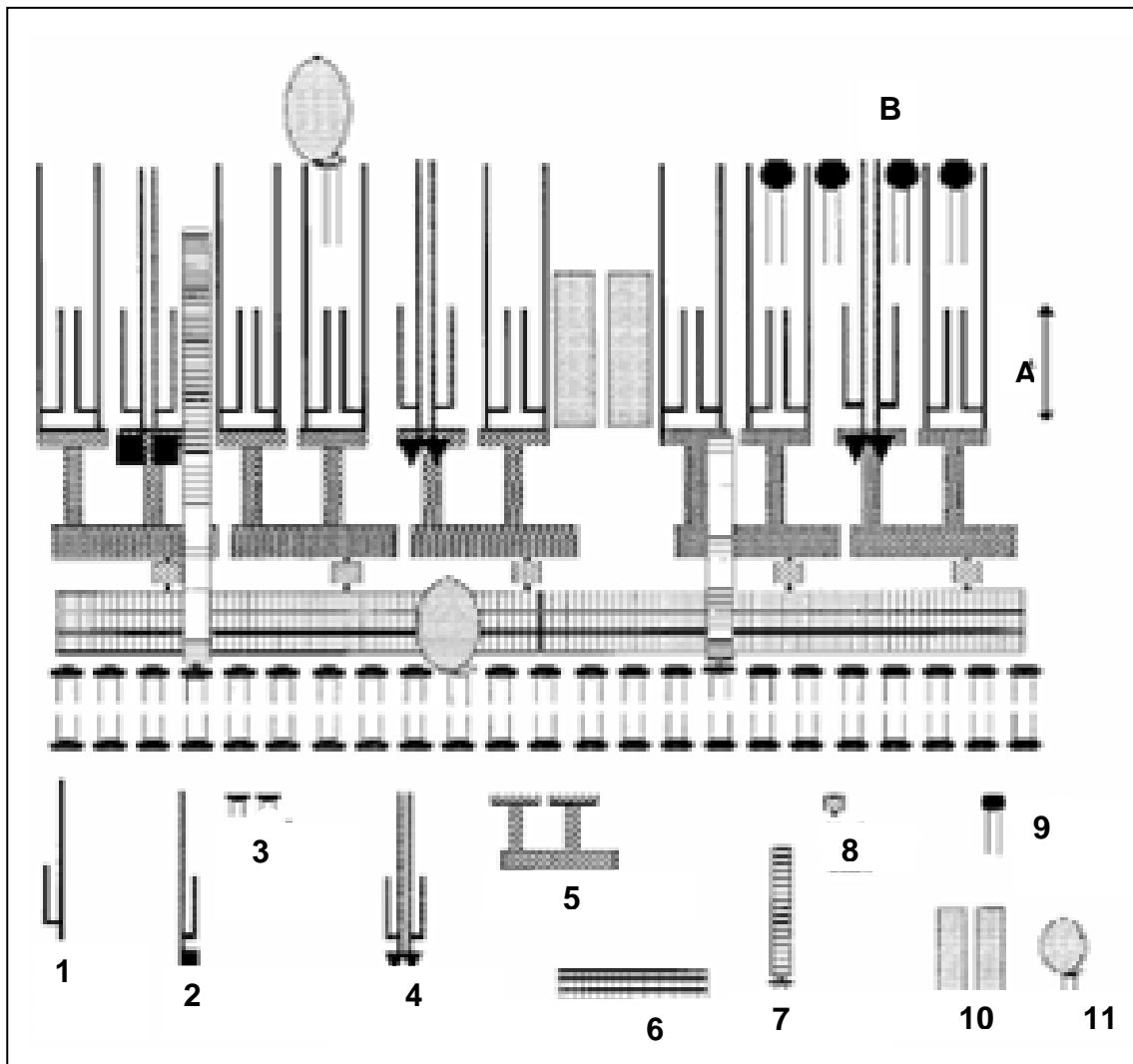
Rhodococcus são actinobactérias aeróbias, Gram-positivas, com alto conteúdo de Guanina e Citosina, contidos em seu DNA. Estes microrganismos apresentam ciclo de vida alternante entre cocos e bastonetes, algumas vezes mostrando projeções filamentosas (FINNERTY, 1992). São amplamente distribuídas no ambiente e habitam diversos nichos ecológicos como nos ambientes marinhos, em solos Alpinos, no Ártico, na Antártica, em águas subterrâneas, excretas de animais, intestinos de insetos e em plantas (BELL e col., 1998; WHYTE e col., 2002; CARVALHO e FONSECA, 2005).

Estudos recentes sobre a atividade metabólica dessas bactérias demonstram sua importância na biotecnologia industrial, farmacêutica e

ambiental. As células de *Rhodococcus erythropolis* e a carga enzimática que dispõem são responsáveis por processos de dessulfurização, oxidação, desidrogenação, hidrólises, hidroxilação e desalogenação (CARVALHO e FONSECA, 2005; SALLAM e col. 2006). Além disso, são produtoras de carotenóides, que têm propriedades antioxidantes (SALLAN e col., 2006).

Bactérias do gênero *Rhodococcus* costumam ser excelentes degradadoras de compostos hidrofóbicos. São capazes de atuar em vários compostos recalcitrantes e possuem uma excepcional capacidade de transformar ou biodegradar compostos hidrofóbicos como parafinas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, bifenilas poliaromáticos policlorados, esteróides e lignina (BICCA e col., 1999; CARVALHO e FONSECA, 2005). A capacidade de degradação de compostos hidrofóbicos por essas bactérias está associada à produção de agentes surfactantes que poderiam auxiliar na assimilação de substratos hidrofóbicos modificando a hidrofobicidade na superfície celular (WHYTE, L.G. e col., 1999).

Bactérias do gênero *Rhodococcus* apresentam um envelope celular de alta complexidade e organização, composto por um esqueleto de peptidoglicana-arabinoglicanas ligados ao ácido micólico. Na Figura 2.6 está representado um modelo da organização da parede celular de *Rhodococcus* sp. A característica predominante do modelo é a complexidade da parede celular na qual o peptidoglicano está ligado por meio de unidades ligantes a arabinogalactanas unidas ao ácido micólico. Estes ácidos micólicos formam a base da barreira lipídica externa (seta A) que apresenta ainda trealose dimicolatos e lipídeos monomicolatos. Esta barreira externa também contém lipídeos anfifílicos (B). Outros componentes são as porinas, lipoproteínas e lipoglicanas. Este envelope celular tem significado ambiental e biotecnológico, importante que pode ser explorado (SUTCLIFFE, 1998).



- | | |
|---------------------------|-----------------------|
| 1- ácido micólico ligado | 7- lipoglicano |
| 2- lipídeos monomicolatos | 8- unidades ligantes |
| 3- membrana lipídica | 9- unidade anfífilica |
| 4- trealose dimicolato | 10- porinas |
| 5- arabinogalactana | 11- lipoproteínas |
| 6- peptideoglicano | |

Figura 2.6 - Organização do envelope celular em *Rhodococcus*: representação esquemática de um modelo proposto. (A) barreira lipídica externa formada por ácidos micólicos e (B) lipídeos anfífilos (SUTCLIFFE, 1998).

Em *Rhodococcus* spp, os ácidos micólicos representam mais de 40% da parede celular e tipicamente contém de 30 a 54 átomos de carbono. Eles podem estar parcialmente livres na forma de trealose dimicolatos e lipídeos monomicólicos (SUTCLIFFE, 1998; LANG e PHILP, 1998).

Os ácidos micólicos são ácidos graxos 2-alquil 3-hidroxi, de alta massa molecular, os quais são encontrados exclusivamente no envelope celular de bactérias do táxon micolata, no qual estão incluídos *Rhodococcus* spp. O ácido micólico confere resistência a danos químicos, baixa permeabilidade a antibióticos hidrofóbicos, a substratos hidrofílicos e resistência a desidratação (BARRY e col., 1998).

Variação de temperatura, baixo pH, limitações nutricionais e presença de solventes orgânicos podem modificar a razão de ácidos graxos saturados e insaturados o que alteraria a fluidez e permeabilidade dos lipídeos da parede celular (BENEY e GERVAIS, 2001; WHYTE e col., 1999; SUTCLIFFE, 1998). A natureza da fonte de carbono utilizada também afeta drasticamente a estrutura das cadeias alquil micolato: substratos hidrofóbicos induzem à síntese de ácido micólico de cadeia alquil longa, comparada às cadeias de ácido micólico de organismos crescidos em substratos hidrofílicos (SOKOLOVSKÁ e col., 2003).

Os biossurfactantes produzidos pelo gênero *Rhodococcus* podem apresentar a natureza química de um glicolípídeo como também já foram relatadas produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) com propriedades tensoativas (NEU, 1996; IWABUCHI e col., 2002; URAI e col., 2002). Os glicolípídeos produzidos por *Rhodococcus* apresentam menor toxicidade que os surfactantes purificados de outras bactérias, surfactantes sintéticos e formulações para biorremediação como Inipol EAP22 (Tabela 2.7) (IVSHINA e col., 1998).

Tabela 2.7 - Toxicidade de biossurfactantes comparada aos surfactantes sintéticos (IVSHINA e col., 1998).

Surfactantes	IC ₅₀ de <i>Vibrio fischeri</i> (mg/L)
Complexo glicolípido de <i>R. ruber</i>	650 ± 150
Trealose dicorinomicolato de <i>R. erythropolis</i>	49
Trealosetetraester de <i>R. erythropolis</i>	286
Raminolipídeos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
Nonilfenol-(óxido de etileno) 9-acetato (EQ9)	78
Estearato de sacarose (DK50)	67
Finasol (OSR5)	7
Corexit (9597)	5
Inipol EAP22	0,4 ± 0,2

O potencial de aplicação do biossurfactante produzido por *Rhodococcus* é reconhecido, mas, como acontece com outros biossurfactantes, não tem penetração no mercado (MUKHERJEE e col., 2007).

As principais espécies de *Rhodococcus*, não patogênicas, apontadas como boas produtoras de biossurfactante, são *R. erythropolis*, *R. ruber*, *R. opacus* e *R. rhodochrous*.

2.9.1 Produção de Biossurfactante por *Rhodococcus* spp.

A produção de biossurfactante por *Rhodococcus* spp. vem sendo estudada por vários autores. Vários tipos e diferentes concentrações do bioproduto foram obtidas (de 0,1 até 30 g/L) dependendo das condições de cultivo (Tabela 2.8). Alguns trabalhos que relataram a produção de glicolípido do tipo trealoselípido por *Rhodococcus* spp. são citados a seguir.

Tabela 2.8 - Trabalhos relevantes nos quais foram verificadas as condições de cultivo, a concentração (g/L) de biossurfactantes produzidos por *Rhodococcus* sp e suas características físico-químicas.

Bactéria	Produção (g/L)	Q _P (g/l.h)	Condições de cultivo	Tipo de biossurfactante	Caracterização físico-química	Referência
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	2,1	0,058	2% n-alcanos Sulfato de amônio 30°C 60h (biorreator)	Trealoselipídeo	ND	RAPP e col. (1979a)
	0,8	ND	2% glicerol	ND		
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	3,5	0,036	2% glicerol Sulfato de amônio 30 °C 96h (biorreator)	Polissacarídeo	ND	RAPP e col. (1979b)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	*32,0	0,2	10% n-C10 Sulfato de amônio pH 7 para 6.5 30 °C para 22 °C 160h (biorreator)	Trealoselipídeo	TS – 26 mN/m TI - < 1 mN/m CMC – 15 mg/L	KIM e col. (1990)
<i>Rhodococcus</i> sp H13A	0,49	0,005	Hexadecano Sulfato de amônio C/N 3,4 28°C 144h	Trealoselipídeo	TS – 30,0 mN/m TI – < 5 mN/m CMC – 1,5 mg/L	SINGER e col. (1990)
<i>Rhodococcus</i> sp	0,158	ND	2,5% Hexadecano Nitrato de sódio 25 °C 140h	Polissacarídeo	ND	NEU e col. (1992)

Tabela 2.8 – Continuação

Bactéria	Produção (g/L)	Q _P (g/l.h)	Condições de cultivo	Tipo de biossurfactante	Caracterização físico-química	Referência
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	3,0	0,019	25,9% Tridecano Nitrato de sódio 160 h 30°C	Trealoselipídeo	TS – 30 mN/m	ESPUNY e col. (1996)
	0,18	ND	2% glicerol		TS – 48 mN/m	
<i>Rhodococcus ruber</i>	ND	ND	1% diesel Nitrato de sódio 168h 37°C	ND	TS – 50,0 mN/m E24 63%	BICCA e col. (1999)
<i>Rhodococcus ruber</i>	*9,9 0,59 4,01 1,79	ND	3% Hexadecano 3% Dodecano 3% Pentadecano 3% tetradecano Nitrato de sódio 27°C	Trealoselipídeo	TS – 27,4 mN/m TI – 2,73 mN/m	PHILP e col. (2002)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	0,9 1,0 1,65 0,7	ND	1% etanol 1% parafina líquida 2% hexadecano 1% glicose Nitrato de potássio 30 °C 168h	Complexo de glicolipídeo, polissacarídeos e proteína	TS – 30, mN/m E24 78%	PIROG e col. (2004)

Tabela 2.8 - Continuação

Bactéria	Produção (g/L)	Q _P (g/l.h)	Condições de cultivo	Tipo de biossurfactante	Caracterização físico-química	Referência
<i>Rhodococcus opacus</i> 1CP	ND	ND	1% n-alcanos 30°C	Trealoselipídeo	ND	NIESHER e col. (2006)
<i>Rhodococcus wratislaviensis</i>	3,1	ND	2% Hexadecano Sulfato de amônio 28°C 70h	Trealoselipídeo	TS – 28,4 mN/m	TULEVA e col. (2008)
<i>Rhodococcus</i> spp	*10,9	ND	0,16 % manitol + 6,38 % hexadecano Extrato de levedura e peptona 30°C, 36 h	Proteína e carboidratos	TS – 30,8 mN/m CMC- 120 mg/L E24 79%	MUTALIK e col. (2008)

ND: não determinado

* concentração obtida por massa seca de produto

RAPP e col. (1979a) verificaram a produção de 2,1 g/L de trealoselipídeo por *Rhodococcus erythropolis*, o qual foi induzido pela presença de 2% de n-alcenos como fonte de carbono, a 30°C, em biorreator. Quando o microrganismo foi crescido em 2% de glicerol foi verificada uma produção de 0,8 g/L do mesmo glicolipídeo. Os autores concluíram que a produção do glicolipídeo foi induzida pelos alcanos.

KIM e col. (1990) obtiveram produção de mais de 30g/L de trealose-2,2',3,4-tetraester por *Rhodococcus erythropolis*, utilizando-se uma mistura de hidrocarbonetos, variando a temperatura de 30° para 22°C e pH 7 para 6,5, em 160h de cultivo. A produção teve início quando sulfato de amônio se exauriu. A produção não foi associada ao crescimento sendo, portanto, um metabólito secundário. A taxa específica de produção de biossurfactante foi de 4 g/g de célula e a conversão de substrato em produto foi de 0,35g de biossurfactante/g de óleo. A produção foi conduzida em batelada simples, com uso de "resting cell" com n-decano como fonte de carbono. A produção de biossurfactante não foi detectada quando a bactéria foi crescida em glicose como fonte de carbono.

SINGER e col. (1990) obtiveram uma produção de 0,49 g/L de trealoselipídeo, em meio contendo hexadecano e sulfato de amônio numa razão de 3,4.

ESPUNY e col. (1996) estudaram a produção e a composição do glicolipídeo. Diferentes fontes de carbono hidrofóbicas e hidrofílicas foram utilizadas. Obtiveram produção entre 1,52 e 2,43 g/L quando utilizaram n-alcenos de 12 a 16 carbonos e entre 0,12 e 0,54 g/L quando utilizaram fontes de carbono hidrofílicas como glicose, glicerol, frutose e citrato. Diferentes comprimentos de cadeia da porção graxa foram observados em função da fonte de carbono utilizada, variando de C8 a C11. Os resultados mostraram que a melhor fonte de carbono foi n-tridecano, com uma produção de 2,43 g/L de glicolipídeo. A concentração celular obtida foi de 4,4 g/L, com $Y_{P/X}$ de 0,55. O uso do glicerol como fonte de carbono, nas condições impostas, possibilitou produção de 0,18 g/L de glicolipídeo. Com o meio otimizado a cinética de produção do biossurfactante foi acompanhada, tendo sido verificada uma

produção associada ao crescimento, que teve início após 28 horas de incubação, quando o nitrato de sódio estava exaurindo. Após 80 h, 1% da fonte de carbono foi adicionada e pôde-se notar aumento da concentração celular e produção do biossurfactante, que atingiu concentração de 3g/L após 160 horas.

WHYTE e col. (1999) verificaram que a bactéria *Rhodococcus* sp Q 15, com espécie ainda não identificada, mas com proximidade a *Rhodococcus erythropolis*, produziu surfactante em meio mineral com 0,3% de hexadecano, a 24°C. A produção foi associada ao crescimento e o surfactante estava presente na parede celular. Quando a bactéria foi inoculada em meio mineral com 0,2% de glicose, não foi verificada redução da tensão superficial do meio, não havendo produção de surfactante em glicose. Esses mesmos autores verificaram a produção de exopolissacarídeos no meio utilizado. O biossurfactante não foi quantificado.

No trabalho de PHILP e col. (2002), foi estudada a capacidade de produção de biossurfactante por *Rhodococcus ruber*, contrapondo-se à produção de *R. erythropolis*. A produção foi acompanhada de maneira indireta pela diluição micelar crítica (DMC) e redução das tensões superficiais e interfaciais. A quantificação se deu no final do processo. Os autores realizaram experimentos em frascos agitados e em reator em processo contínuo de alimentação de fonte de nitrogênio e fonte de carbono. O meio de cultura utilizado para experimentos em frascos agitados era composto de nitrato de potássio e 3% de hexadecano, com pH 7, 200 rpm, a 27°C. Dos resultados obtidos pelos experimentos comparativos de *R. ruber* e *R. erythropolis*, os autores concluíram que com *R. ruber* a DMC foi 100x maior. Em experimento posterior, *R. ruber* foi exposta a diferentes fontes de carbono hidrofóbicas. Foi obtida maior concentração de surfactante bruto (por peso seco) em hexadecano (9,9 g/L), comparado com dodecano (0,59 g/L), tetradecano (1,79 g/L) e pentadecano (4,01 g/L). A taxa de crescimento específica máxima (μ_x) foi de 0,236 h⁻¹. Como a produção do biossurfactante foi associada ao crescimento, foram realizados experimentos em reator em processo contínuo de alimentação, primeiramente com hexadecano e depois com nitrato. Nestes experimentos, não foram realizadas quantificações de produto e biomassa, os

gráficos apenas mostram a diminuição das tensões superficial e interfacial e o fator de diluição micelar crítica. O maior fator DMC foi de 30x, atingido em 160 horas de experimento quando a fonte de carbono foi adicionada. No experimento com adição de nitrato, foi verificado um aumento do fator DMC de 20x para 50x quando a concentração de nitrogênio alcançou seu mínimo.

PIROG e col. (2004) investigaram a produção de biossurfactante por *Rhodococcus erythropolis* em substratos hidrofílicos e hidrofóbicos, em frascos agitados. A produção variou de 0,2 a 1,65 g/L. Os autores relataram que o biossurfactante era composto de um complexo de glicolípido, polissacarídeos e proteína, com propriedades tensoativas e emulsificantes diferenciadas. Estes resultados confirmam que a fonte de carbono foi determinante na natureza do produto.

Biossurfactantes do tipo trealose dinocariomicolatos foram obtidos por NIESHER e col. (2006), crescendo *Rhodococcus opacus* 1CP em um meio contendo n-alcanos, a 30°C. Observou-se uma produção associada ao crescimento bacteriano e concentração de 0,5 mg/mL do bioproduto em n-tetradecano e n-hexadecano.

TULEVA e col. (2008) estudaram a produção de trealose tetraester de *Rhodococcus wratislaviensis*, crescida em hexadecano, a 28°C, em frascos agitados. A produção foi de 3,1 g/L no final de 70 horas de experimento.

A quantificação da produção de bioemulsificantes do tipo polissacarídeo por *Rhodococcus* sp foi verificada em poucos trabalhos.

RAPP e col. (1979b) verificaram uma produção de 3,1 g/L de polissacarídeo quando a bactéria foi crescida em glicerol, a 30°C. O polissacarídeo foi caracterizado sendo constituído por glicose, manose e uma pequena porção de proteína.

NEU e col. (1992) obtiveram produção de 158 mg/L de polissacarídeo (constituído de ramnose, galactose, glicose e ácido glucurônico) de uma linhagem de *Rhodococcus* crescido em hexadecano, a 30°C.

MUTALIK e col. (2008) trabalharam com a otimização do meio de cultivo para produção de biossurfactante por *Rhodococcus* spp, empregando a metodologia de superfície de resposta. Em estudo preliminar, em frascos agitados, sugeriram que os componentes críticos do meio de cultura a serem estudados seriam: manitol como fonte de carbono, extrato de levedura, peptona de carne e n-hexadecano como indutor da produção do tensoativo. A concentração destes quatro elementos foi otimizada alcançando uma produção de biossurfactante de 10,9 g/L, 3,4 vezes o valor inicial encontrado que era de 3,2 g/L. O biossurfactante foi extraído no final do experimento otimizado, utilizando metil-tetra-butil éter (MTBE) e quantificado por peso seco. O biossurfactante bruto apresentou 18,5% de proteína e 51,2% de carboidratos totais.

No Brasil, poucos são os trabalhos realizados com biossurfactantes produzidos por *Rhodococcus*. Pode-se destacar o estudo de BICCA e col. (1999). Estes autores compararam a habilidade para produzir surfactante por cepas de *Rhodococcus ruber* e *R. erythropolis*, avaliando três meios de cultura. O índice de emulsificação (E_{24}) foi utilizado para verificar a produção de biossurfactante. Os autores obtiveram melhor resultado utilizando-se a bactéria *Rhodococcus ruber* no meio contendo extrato de levedura e 1% de diesel como fonte de carbono, em pH7, com agitação constante de 200 rpm, a 37°C. O E_{24} obtido foi de 63%. A tensão superficial do meio foi reduzida para 50 dina/cm em 48 horas e o surfactante estava associado à parede celular. O trabalho não especificou a concentração e o tipo de surfactante produzido.

2.10 Considerações Gerais

Um panorama geral sobre biossurfactantes, apontando os tipos, vantagens e desvantagens frente aos seus homólogos sintéticos, foi apresentado nesta revisão bibliográfica. O destaque maior foi dado à produção de biossurfactante de *Rhodococcus* spp.

Estudos de produção de biossurfactante por *Rhodococcus* sp são relatados desde 1979, com RAPP e col., os quais enfatizaram a produção de glicolipídeos e polissacarídeos dependendo da fonte de carbono utilizada.

Desde então, foram poucos os trabalhos desenvolvidos de otimização da produção de biossurfactante por essa bactéria, como pode ser visto de maneira resumida na Tabela 2.8. Dentre esses estudos, o enfoque foi para a produção de biossurfactantes por *Rhodococcus* sp do tipo glicolipídeos, variando-se as fontes de carbono, mas nem sempre obtendo-se a caracterização físico-química do tensoativo, como TS, TI, CMC e atividade emulsificante. Analisando-se esses trabalhos, nota-se que, a temperatura utilizada para produção do biossurfactante de *Rhodococcus* spp. foi, predominantemente, de 28°C e 30°C, com destaque para o trabalho de BICCA e col. (1999) no qual obteve melhor produção a 37°C; a fonte de nitrogênio variou entre sais de nitrato e de amônio e a fonte de carbono utilizada foi, principalmente, os hidrocarbonetos.

Fica evidente que são escassas as informações que norteiam o desenvolvimento biotecnológico de produção dessas biomoléculas, como o estudo do modo de condução do bioprocessamento objetivando o aumento da sua produção e a determinação de parâmetros cinéticos de produção que indicam a viabilidade econômica do bioprocessamento.

Abre-se, dessa forma, a oportunidade de explorar o potencial de produção de biossurfactantes por *Rhodococcus* e suas possíveis aplicações.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Tendo em vista as restrições econômicas à produção de biossurfactantes, algumas estratégias básicas devem ser adotadas para tornar a produção competitiva: o uso de substratos mais econômicos para reduzir os custos da matéria-prima inicial no processo; o desenvolvimento de bioprocessos eficazes, incluindo otimização das condições de cultivo e processos de separação eficazes em termos de custo a fim de obter a máxima produção e recuperação de biossurfactantes.

Estudos de cinética de produção de biomoléculas geram parâmetros importantes que permitem entender o metabolismo microbiano e ajustá-lo para o interesse biotecnológico. Desta forma, faz-se necessário conhecer o requerimento nutricional do microrganismo para direcionar as rotas metabólicas de interesse garantindo maior produção do bioproduto. Mas o estudo não deve se limitar a isto, e estabelecer formas de condução de um bioprocessos é

indispensável no que tange o aumento da produtividade para tornar o processo economicamente viável.

O investimento em pesquisa de produção de biossurfactantes é justificado pelo bom desempenho dessas biomoléculas, por exemplo, quando aplicados no meio ambiente em processos de biorremediação, os quais têm mostrado favorecer a remoção e biodegradação dos contaminantes e danos ambientais subsequentes.

Muitos são os trabalhos que estudam a produção e aplicação de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* e é sabido que os biossurfactantes produzidos por estas bactérias são eficientes e podem ser produzidos a partir de diversos substratos. Entretanto, a busca por novos biossurfactantes com propriedades distintas dos já encontrados no mercado deverá ampliar ainda mais o leque de utilização destas biomoléculas.

Assim, o objetivo geral deste trabalho foi contribuir para o desenvolvimento de um bioprocesso para a produção de biossurfactante por uma linhagem de *Rhodococcus erythropolis*.

E como objetivos específicos:

- ❖ otimizar as condições de cultivo, considerando-se as seguintes variáveis do processo: fonte de carbono; temperatura; fonte de nitrogênio e razão C/N;
- ❖ estudar a melhor forma de condução do bioprocesso;
- ❖ investigar a localização do biossurfactante e definir estratégias para maximizar sua recuperação;
- ❖ avaliar a ação do biossurfactante no processo de biodegradação de borra oleosa da indústria do petróleo.

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

Rhodococcus erythropolis ATCC 4277 (Figura 4.1) foi obtida do banco de cepas do Laboratório de Microbiologia Ambiental do Instituto de Ciências Biomédicas/USP – SP.



Figura 4.1 – Colônias de *Rhodococcus erythropolis* crescidas em meio de cultura TSA, a 28°C.

4.1.1 Preparo do Inóculo

O inóculo foi crescido em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 150 mL do meio de cultivo (extrato de levedura 3 g/L, peptona 15 g/L e glicerol 1 g/L). A bactéria foi crescida a 28^oC em frascos agitados a 200 rpm durante 24 horas. As células foram recuperadas por centrifugação a 9000 x g por 15 minutos.

Para adaptação das células nas condições de cultivo dos experimentos, as células foram crescidas em meio de cultivo por 12 horas, a 28^oC, para os ensaios nesta temperatura. Nos experimentos de produção do biossurfactante a 37^oC o inóculo foi mantido em meio de cultivo por 12 horas, a 37^oC. As células foram recuperadas por centrifugação e usadas como inóculo.

4.2 Meio de Cultivo

O meio de cultivo basal para produção do biossurfactante foi adaptado do trabalho de PHILP e col., (2002) e sua composição está descrita na Tabela 4.1. O pH foi ajustado para 7,0 e o meio de cultura esterilizado por 15 min, 121^oC.

Tabela 4.1 – Composição do meio de cultivo para produção do biossurfactante.

Composição	Concentração (g/L)
KH ₂ PO ₄	2,0
K ₂ HPO ₄	1,0
KNO ₃	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0
NaCl	1,0
MgSO ₄	1,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02
FeCl ₃ .7H ₂ O	0,01
Extrato de Levedura	0,1

Esse meio basal foi alterado, posteriormente, sendo o nitrato de potássio substituído por nitrato de sódio, mantendo a razão C/N, e o extrato de levedura foi retirado nos experimentos de fonte de nitrogênio e razão C/N.

4.3 Estudo das Condições de Cultivo para Melhorar a Produção de Biossurfactante por *Rhodococcus* sp

Para verificar o efeito de diferentes variáveis do processo de produção do biossurfactante foram estudadas as seguintes variáveis: fonte de carbono (1% de n-hexadecano e 2% de glicerol); temperatura de 28 e 37°C; fontes de nitrogênio (sulfato de amônio, nitrato de sódio e ambos) e a razão C/N de 5, 14 e 40.

Os experimentos foram realizados em frascos agitados a 200 rpm por 7 dias e em biorreator modelo Biostat® B, (B. Braun Biotech International – Alemanha) (Figura 4.2) de acordo com as variáveis testadas. No biorreator, foi utilizado vaso com capacidade de 5 L e com volume de 1,5 L de meio de cultivo. O pH do meio foi mantido em 7 com adição de solução NaOH 4 mol/L e HCl 4 mol/L, a oxigenação foi mantida constante em 20% da saturação de oxigênio e a agitação variou automaticamente de modo a manter esta oxigenação. O ar foi introduzido no sistema pela tampa do reator para evitar borbulhamento e conseqüente formação de espuma.



Figura 4.2 - Biorreator Modelo Biostat® B (B. Braun Biotech International – Alemanha).

4.4 Métodos Analíticos

4.4.1 Determinação da Produção de Biossurfactante

A produção do biossurfactante foi estimada por meio do método fenol-sulfúrico (DUBOIS, 1956). Resumidamente, em 0,5 mL de amostra, acrescentaram-se 0,5 mL de solução fenol 5% e 2 mL de ácido sulfúrico. A mistura foi deixada reagir por 15 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, feito a leitura em espectrofotômetro a 460 nm. A curva padrão foi feita utilizando-se diferentes concentrações de glicose. A concentração de biossurfactante foi relatada como concentração equivalente de glicose.

A escolha deste método colorimétrico foi feita porque *Rhodococcus* spp apresenta capacidade de produzir surfactantes da classe de glicolipídeos e polissacarídeos, ambos com uma porção glicídica, conforme citado no item 2.9.1.

No experimento do estudo da fonte de carbono, o meio fermentado com células foi sonicado (10 KHz, 10 min) (IVSHINA e col., 1998) e, em seguida, as células foram removidas por centrifugação a 9000 x g por 15 min. O sobrenadante foi utilizado para quantificação do biossurfactante.

No estudo da influência da temperatura na produção do tensoativo, não foi mais realizado o processo de sonicação, mas a quantificação do biossurfactante também foi realizada no meio fermentado livre de células.

Nos experimentos do estudo da fonte de nitrogênio e razão C/N a quantificação foi realizada após recuperação do biossurfactante do meio fermentado com etanol (-4°C) 95%, conforme descrito na seção 4.5.

4.4.2 Medida da Concentração celular

A concentração celular nas culturas submersas de *Rhodococcus erythropolis* foi expressa em massa seca (g/L) após determinação do valor da absorvância a 600 nm e sua correlação com a massa seca, através da curva padrão previamente realizada.

4.4.3 Dosagem de Glicerol

O glicerol utilizado como fonte de carbono foi quantificado através de método enzimático-colorimétrico (GPO-POD) usando reagentes para dosagem de triglicerídeos em soro ou plasma da LaborLab (Brasil) (Método enzimático-colorimétrico - GPO/POD. Artigo nº 0554 – CELM). Uma solução de glicerol 1 g/L foi utilizada para levantar a curva padrão. A leitura colorimétrica foi feita em espectrofotômetro a 505 nm.

4.4.4 Dosagem de Nitrogênio

Para quantificação de nitrogênio do nitrato de sódio foi utilizado o método ácido sulfúrico-brucina. Em resumo, 2,0 mL de solução de brucina (0,6 g/L de sulfato de brucina em ácido sulfúrico a 80% (v/v) foram adicionados a 0,5 mL de amostra e aquecidos em água fervente por 15 minutos. A reação foi imediatamente paralisada por resfriamento em banho de gelo e realizada leitura de absorvância a 410 nm. Os valores de absorvância foram convertidos em concentração (g/L) por meio do uso de curva-padrão com concentrações conhecidas de nitrato de sódio. Este método é sensível para amostras contendo entre 1 e 50 mg/L de NaNO_3 (Adaptado de Colorimetry and Turbidimetry - Reagent Chemicals 9ª Ed. ACS Specifications. 2000, ©2000 American Chemical Society). Para a dosagem de nitrogênio amoniacal utilizou-se o método da solução de fenolato-hipoclorito que consiste na adição de 4,5 mL de amostra em 3,5 mL de solução fenolato e 1,5 mL de solução de hipoclorito 0,9 % (v/v). Após 20 minutos, em temperatura ambiente, foi feita a leitura de absorvância a 690 nm. As concentrações (g/L) foram obtidas através da construção da curva padrão com concentrações de sulfato de amônio conhecidas. A solução de fenolato consiste de 20 mL de solução fenol com 20 mL de solução de NaOH 27 g/L. A solução de fenol é preparada com 62,4 g de fenol com 25 mL de etanol e completando o volume de 100 mL com água destilada (WAINWRIGHT e PUGH., 1973). O teste possui a sensibilidade de 0,005 a 0,01 g/L de nitrogênio amoniacal.

4.5 Recuperação do Biossurfactante do Meio Fermentado Livre de Células

Sabendo-se que *Rhodococcus* sp é capaz de produzir glicolipídeos e polissacarídeos, as metodologias de recuperação do biossurfactante do sobrenadante foram realizadas de acordo com essas duas classes de biossurfactante. Desta forma, foi possível supor qual era o composto predominante na fermentação, de acordo com as condições de cultivo.

Primeiramente, 200 mL de meio fermentado foram retirados e as células removidas por centrifugação a 9000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi concentrado em rotavapor a 45°C, até se obter um volume de 20 mL. A partir daí foi realizada a recuperação do biossurfactante.

Para recuperar o glicolipídeo, foi utilizada a extração líquido-líquido, mediante o uso dos sistemas solventes CHCl₃: Metanol (razão 2:1) (PHILP e col., 2001). Em 2 mL do sobrenadante concentrado foram adicionados 4 mL do sistema de solventes e agitado vigorosamente. Em seguida, a fase orgânica foi recuperada e reservada. Procederam-se mais 2 extrações. A fase orgânica foi removida por evaporação em rotavapor a 45°C e o resíduo foi ressuspendido em 2 mL de água destilada para posterior quantificação do biossurfactante pelo método fenol-sulfúrico. Todas as extrações foram realizadas em duplicata.

Para determinar se houve produção de polissacarídeo foi realizada a precipitação com etanol em várias etapas, de modo a diminuir os resíduos (sais inorgânicos) que pudessem precipitar juntamente com o polissacarídeo e interferir na quantificação do biossurfactante (KUMAR e col., 2004). Em 2 mL do sobrenadante concentrado foram adicionados 20 mL de etanol (-4°C) 95%. A mistura foi homogeneizada e permaneceu em repouso a 4°C por 24 horas. Transcorrido o tempo, o precipitado foi recuperado por centrifugação a 3000 x g por 15 minutos e ressuspendido em 2 mL de água destilada. A precipitação foi realizada novamente nas mesmas condições. Após centrifugação, o precipitado foi lavado 2 vezes com etanol (-4°C) 70% (KORNMANN e col. 2003). A

quantificação do biossurfactante foi realizada pelo método fenol-sulfúrico. A extração foi realizada em duplicata.

Cabe aqui ressaltar que o método fenol-sulfúrico é empregado em vários trabalhos para quantificação de açúcares totais presentes no exopolissacarídeo produzido por diferentes microrganismos (LIN e CHEN, 2007; KORNMANN e col. 2003; HWANG e col., 2003).

4.5.1 Seleção de Solvente para Recuperação do Biossurfactante por Precipitação

Foi realizado estudo a fim de definir o solvente mais adequado para precipitação do biossurfactante com vistas para incrementar sua recuperação do meio fermentado. Os solventes escolhidos e os volumes utilizados (solvente:meio fermentado livre de células) foram os apontados na literatura como eficientes na precipitação de polissacarídeos. Assim, foram utilizados como solventes: acetona 4:1 e 3:1 (GARCIA-OCHOA e col., 2000); etanol (-4°C) 95% 4:1 e 3:1 (KUMAR e col., 2004); etanol (-4°C) 95% com 5% metanol 4:1 e 3:1 (HUNG e col., 2005); isopropanol 4:1 e 3:1 (GARCIA-OCHOA e col., 2000).

Os solventes foram homogeneizados no sobrenadante concentrado por rotaevaporação (seção 4.5) e a mistura permaneceu a 4°C. Transcorridas 24 horas, o precipitado foi recuperado por centrifugação a 3000 x g por 15 minutos e ressuspenso em água destilada. A quantificação do biossurfactante foi realizada pelo método fenol-sulfúrico. O experimento foi realizado em duplicata.

4.5.2 Estudo da Recuperação do Biossurfactante por Precipitação com Etanol (-4°C) 95%

Para averiguar qual a melhor proporção solvente:meio fermentado livre de células para recuperação do biossurfactante produzido, foram realizadas

extrações com variados volumes de etanol (-4°C) 95% (1:1 até 7:1) para obter a condição de maior recuperação do biossurfactante com esse solvente.

O etanol (-4°C) 95% foi homogeneizado no meio fermentado livre de células e a mistura permaneceu a 4°C por 24 horas. Transcorrido o tempo, o precipitado foi recuperado por centrifugação a 3000 x g por 15 minutos e ressuspenso em 1 mL de água destilada. A quantificação do biossurfactante foi realizada pelo método fenol-sulfúrico. Todo experimento foi realizado em duplicata.

Um teste comparativo foi realizado para verificar diferenças na quantificação do biossurfactante recuperado pela técnica de precipitação em várias etapas, segundo KORNMAN e col. (2003), e pela técnica de precipitação com etanol (-4°C) 95% em uma única etapa, segundo KUMAR e col. (2004). Em quatro tubos de ensaio contendo 2 mL do meio fermentado livre de células foram adicionados etanol (-4°C) 95% (4:1). A mistura permaneceu a 4°C por 24 horas. O precipitado foi recuperado por centrifugação a 3000 x g por 15 minutos e ressuspenso em 2 mL de água destilada. Em dois destes tubos (duplicata), aplicou-se a técnica de precipitação em várias etapas. Assim, nova precipitação com etanol (-4°C) 95% foi realizada e após 24 horas o biossurfactante bruto foi removido por centrifugação. O precipitado foi lavado 2 vezes com etanol (-4°C) 70% e ressuspenso em 2 mL de água destilada. Nas soluções obtidas pelas duas técnicas foi realizada a quantificação do biossurfactante pelo método colorimétrico fenol-sulfúrico.

4.6 Extração do Biossurfactante Aderido à Parede Celular

Para tentar maximizar a recuperação do biossurfactante que pudesse estar aderido à parede celular, alguns métodos de extração de polissacarídeos foram empregados.

Sonicação: 10 mL do meio fermentado contendo células foram submetidos à sonicação por 0, 10, 22, 34 e 46 minutos (IVSHINA e col., 1998).

As células foram removidas do meio fermentado por centrifugação a 9000 x g por 15 min. Em seguida, procedeu-se a precipitação do biossurfactante do sobrenadante com etanol – 4°C 95% (4:1) e posterior quantificação.

Vapor fluente: 10 mL do meio fermentado contendo células foram submetidos a vapor fluente em autoclave por 15 minutos (adaptado de CHI e col., 2006). As células foram removidas do meio fermentado por centrifugação a 9000 x g por 15 min. Em seguida, procedeu-se a precipitação do biossurfactante do sobrenadante com etanol (-4°C) 95% (4:1) e posterior quantificação.

Extração com EDTA: neste método, as células de uma amostra de 10 mL de meio fermentado foram removidas por centrifugação a 9000 x g por 15 min. O “pellet” de células foi lavado com solução tampão 10 mM (pH 7,0) por duas vezes, e o sobrenadante descartado após centrifugação. As células foram ressuspendidas em 4 mL do mesmo tampão acrescido de EDTA (sal tetrasódico) 2% (p/v) que permaneceu em repouso por 2 horas a 4°C (adaptado de CAMMAROTA e SANT’ANNA, 1998). O sobrenadante obtido por centrifugação a 9000 x g por 15 min. Em seguida, procedeu-se a precipitação do biossurfactante do sobrenadante com etanol (-4°C) 95% (4:1) e posterior quantificação.

Como controle, foi utilizada uma amostra de 10 mL que não passou pelos processos aplicados. As células foram removidas do meio fermentado por centrifugação a 9000 x g por 15 min. Em seguida, procedeu-se a precipitação do biossurfactante do sobrenadante com etanol (-4°C) 95% (4:1) e posterior quantificação. Cada procedimento foi realizado em duplicata.

4.7 Relação entre a Quantificação do Biossurfactante pelo Método Colorimétrico Fenol-Sulfúrico e por Massa Seca.

A quantificação do biossurfactante por massa seca foi realizada para posterior correlação entre os valores de concentração obtidos pelo método colorimétrico fenol-sulfúrico.

Para tanto, em 10 mL de sobrenadante concentrado foram adicionados 40 mL de etanol (-4°C) 95%. A mistura foi homogeneizada e permaneceu em repouso a 4°C por 24 horas. Transcorrido o tempo, o precipitado (biossurfactante bruto) foi recuperado por centrifugação a 3000 x g por 15 minutos e ressuspenso em 10 mL de água destilada. A precipitação foi realizada novamente nas mesmas condições. Após centrifugação, o precipitado foi lavado 2 vezes com etanol (-4°C) 70%. Em seguida, o precipitado obtido foi dialisado, utilizando-se membrana de diálise *Millipore* 12.000 KD por 24 h com agitação constante em água destilada. O biossurfactante bruto recuperado foi deixado em estufa para secar a 37°C e pesado até seu peso permanecer constante.

A partir de uma solução de 20 g/L do biossurfactante bruto (massa seca) foram realizadas diluições sucessivas, obtendo-se várias soluções de concentração de biossurfactante conhecida. Nestas soluções foi realizada a quantificação do biossurfactante pelo método fenol-sulfúrico. Pôde-se, assim, estabelecer uma relação dos valores obtidos pela quantificação por peso seco e fenol-sulfúrico.

4.8 Caracterização Físico-Química do Biossurfactante

O biossurfactante produzido foi caracterizado físico-quimicamente por meio de medidas da tensão superficial, interfacial, Concentração Micelar Crítica (CMC) e do Índice de Emulsificação (E_{24}).

As medidas das tensões superficial e interfacial foram realizadas em meio livre de células e no biossurfactante bruto, utilizando-se o Tensiômetro Du Nuoy (modelo Kruss Tensiometer, K9 - Alemanha). A tensão interfacial foi medida com n-hexadecano como fase hidrofóbica.

Para determinar a Concentração Micelar Crítica (CMC), foi medida a tensão superficial do biossurfactante bruto diluído em diferentes concentrações.

A CMC estabelecida foi o ponto de inflexão da curva do gráfico de tensão superficial X concentração de biossurfactante.

Para verificar a capacidade emulsificante do biossurfactante, foi obtido o Índice de Emulsificação. O teste foi realizado pela adição de 2 mL de n-hexadecano para 2 mL do sobrenadante ou do surfactante bruto misturado em alta velocidade por dois minutos. O Índice de Emulsificação (E_{24}) foi medido após 24 horas. Este índice é determinado medindo-se a altura da camada emulsificada dividindo- pela altura do volume total, multiplicada por 100 para expressão em percentual (COOPER e GOLDENBERG, 1987).

4.8.1 Influência do pH na Tensão Superficial

Para verificar a influência do pH na redução da tensão superficial pelo biossurfactante bruto, realizou-se medidas de tensão superficial em soluções de biossurfactante 0,6 g/L com pH variando de 1 a 13. O pH foi ajustado adicionando-se soluções de 1 mol/L HCl e 1 mol/L NaOH. O pH das soluções foi determinado com o potenciômetro da Marca Digimed, modelo MS-21, na temperatura de 25°C.

4.9 Caracterização Parcial da Estrutura do Biossurfactante

4.9.1 Hidrólise Ácida

Após fermentação, 200 mL de meio fermentado foram retirados e as células removidas por centrifugação a 9000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi concentrado em rotavapor a 45°C. Em 10 mL de sobrenadante concentrado foram adicionados 40 mL de etanol (-4°C) 95%. A mistura foi homogeneizada e permaneceu em repouso a 4°C por 24 horas. Transcorrido o tempo, o precipitado (biossurfactante bruto) foi recuperado por centrifugação a 3000 x g por 15 minutos e ressuspenso em 10 mL de água destilada. A precipitação foi realizada novamente nas mesmas condições. Após

centrifugação, o precipitado foi lavado 2 vezes com etanol (-4°C) 70%. Em seguida, o precipitado obtido foi dialisado, utilizando-se membrana de diálise *Millipore* 12.000 KD por 24 h com agitação constante em água destilada. O biossurfactante bruto recuperado foi deixado em estufa para secar a 37°C.

Para a hidrólise ácida, 100 mg do biossurfactante bruto foram adicionados a 1 mL de Ácido Trifluoracético (TFA) 2 mol/L, que permaneceu a 120°C por 1 hora (BONILLA e col., 2005). Em seguida, o ácido foi removido por evaporação em rotavapor a 37°C. O resíduo foi ressuspensionado em Tampão Fosfato pH 7. A neutralidade da amostra foi alcançada adicionando-se Bicarbonato de Sódio.

Para caracterização dos açúcares constituintes do biossurfactante foi empregada a metodologia de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), utilizando-se como referência os padrões da Merck. As condições de análise foram:

- fase estacionária: coluna HPX (Biorad)
- fase móvel: água Milli-Q
- vazão da fase móvel: 0,6 mL/min,
- volume de injeção: 20µL
- temperatura de coluna 75°C
- detecção por Diferencial de Índice de Refração (DIR)

4.9.2 Dosagem de Proteína

Para verificar a presença de proteína no biossurfactante bruto foi utilizado o Método de Lowry (LOWRY e col., 1951). Este método é sensível para concentrações de proteína na ordem de µg/L. Albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como proteína padrão para construção das curvas de referência.

4.10 Estudo do Efeito do Biossurfactante na Biodegradação de Borra Oleosa da Indústria do Petróleo

Este experimento foi proposto com o intuito de verificar o efeito do biossurfactante bruto aplicado em um processo de biodegradação. Para tanto, foi utilizado um resíduo oleoso proveniente do separador água/óleo (SAO) da Unidade de Negócios de Exploração e Produção de Sergipe e Alagoas (UN-SEAL) da Petrobrás, Campo de Produção de Carmópolis, da Estação Coletora de Nova Magalhães. As características da borra oleosa (Tabela 4.2) foram obtidas a partir de caracterizações prévias realizadas por MELO (2004).

Tabela 4.2 - Caracterização do resíduo oleoso de fundo de separador O/A de Unidade de Exploração & Produção da Petrobrás em Sergipe e Alagoas. (MELO, 2004).

Parâmetro	Borra SAO	Limite NBR 10004
Ponto fulgor	118 °C	---
Água livre	20 % (m/m)	---
pH	6,7	2 < pH < 12,5
Cinzas	200 mg/Kg	---
Sódio	550 mg/L	200 mg/L
Manganês	0,19 mg/L	0,1 mg/L
Ferro	0,05 mg/L	0,3 mg/L
Cloreto	860 mg/L	250 mg/L
Cromo total	260 mg/Kg	---
Mercúrio	8,4 mg/Kg	100 mg/Kg
Chumbo	130 mg/Kg	1.000 mg/Kg
Óleos e Graxas (parafínicos/TPH)	91000 mg/Kg	<50000 mg/Kg
PAH's	68 mg/Kg	---

Os ensaios foram realizados em Respirômetro (Bioscience – BI 2000) (Figura 4.3), que registrou o consumo de oxigênio pelos microrganismos autóctones da borra oleosa ao longo do tempo. Em cada ensaio foi utilizado o frasco específico do equipamento, com capacidade de 1000 mL, contendo 150 mL de meio Bushnell-Hass (BH) acrescido de 10% de borra oleosa (p/v). O biossurfactante bruto, ressuspenso em água destilada, foi adicionado nas concentrações de 0 (controle); 0,42 g/L, que corresponde a CMC do

biossurfactante; 0,84 g/L , 2 x CMC; 0,21 g/L, 1/2 x CMC. O experimento foi realizado em duplicata, totalizando, portanto, oito ensaios. Os frascos foram mantidos por 168 horas, à temperatura de 30°C, com agitação constante promovida por agitador magnético em cada frasco.



Figura 4.3 – Respirômetro Bioscience/BI -2000

Neste experimento foi realizada a contagem de bactérias autóctones da borra oleosa. Para quantificar as bactérias no início do experimento, foi preparada uma solução salina (0,7%) contendo 10% de borra oleosa (p/v), que permaneceu em agitação de 100 rpm por 1 hora. A quantificação da microbiota final foi realizada retirando-se 10 mL de cada ensaio no término do experimento. Foram realizadas diluições sucessivas das soluções para plaqueamento em superfície em meio de cultura Tryptic Soy Agar (TSA). As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas e o resultado expresso em unidades formadoras de colônias (UFC)/ g de borra oleosa. A contagem foi feita em duplicata.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção do Biossurfactante

5.1.1 Fonte de Carbono

Neste trabalho, glicerol e n-hexadecano foram utilizados como fontes de carbono hidrofílica e hidrofóbica, respectivamente, para avaliar a produção de compostos tensoativos. Os experimentos iniciais foram realizados em frascos agitados, sem acompanhamento da cinética de produção.

A concentração do biossurfactante, obtida a partir do meio fermentado, está apresentada na Tabela 5.1. Após sonicação do meio fermentado com células, verificou-se um aumento de 4 vezes na concentração do tensoativo produzido na presença de n-hexadecano. Este resultado evidenciou que o biossurfactante estava aderido à parede celular. Em relação à produção em glicerol, não foi verificada diferença significativa na concentração do surfactante

após sonicação. A produção de biossurfactante foi confirmada pela atividade emulsificante de 58% e 60% dos meios fermentados com n-hexadecano e glicerol, respectivamente.

Tabela 5.1 - Concentração de biossurfactante (em g/L) obtida antes e após sonicação do meio fermentado e Índice de Emulsificação (E_{24}) do meio sonificado livre de células.

Tratamento (sonicação)	Fonte de Carbono	
	n-hexadecano 1%	glicerol 2%
Antes	0,10 ± 0,03	0,40 ± 0,04
Após	0,40 ± 0,04 (E_{24} 58 %)	0,45 ± 0,04 (E_{24} 60 %)

De acordo com LANG e PHILP (1998), somente uma porção (10%) do surfactante produzido por *Rhodococcus* sp, em substrato hidrofóbico, é liberado para o meio de cultura.

Isto pode ser explicado pela função fisiológica que o biossurfactante tem para a célula produtora, no mecanismo de assimilação e transporte de hidrocarbonetos (WAGNER, 1983). Este mecanismo consiste no contato direto da gota de óleo com o microrganismo, no qual o biossurfactante produzido fica retido na parede celular, facilitando o transporte de alcanos para o interior da célula; ou no contato do microrganismo com pequenas gotas de óleo emulsificadas pela atuação do biossurfactante extracelular. Neste caso, o biossurfactante seria liberado para o meio e este formaria um complexo surfactante-alcano, aumentando sua solubilidade e, conseqüentemente, sua disponibilidade para posterior assimilação (BEAL, 2000).

Pelos resultados obtidos verificou-se que o glicerol foi capaz de promover a produção e liberação do biossurfactante. O glicerol apresenta maior permeabilidade na parede celular o que dispensaria a necessidade da bactéria manter o biossurfactante aderido à parede, a fim de auxiliar na sua assimilação. Os trabalhos que sugerem que a maior parte do biossurfactante produzido por *Rhodococcus* sp se mantém ligada à parede celular, utilizaram hidrocarbonetos como fonte de carbono, o que induziria a bactéria sintetizar e

reter o biossurfactante produzido, de modo a aumentar a hidrofobicidade da parede celular, promovendo melhor assimilação destes compostos.

No decorrer dos experimentos, realizados em frascos agitados, foi verificada uma queda acentuada do pH do meio de cultura que continha glicerol como fonte de carbono, apesar do tamponamento, diminuindo de pH 7, no início do processo, para 4,5 – 5,0 após 2 dias. Essa acidificação do meio poderia interferir na produção do biossurfactante, uma vez que são valores considerados bioestáticos para muitos microrganismos.

ESPUNY e col. (1996) e PIROG e col. (2004) relataram a diminuição nos valores de pH do meio de cultura (de 7,0 para 5,3 – 5,5), tornando uma condição inibitória para o crescimento celular, quando utilizaram amônio como fonte de nitrogênio, independentemente da fonte de carbono utilizada.

O meio de cultura utilizado para esse experimento continha sulfato de amônio, o que poderia explicar o decréscimo do pH. Entretanto, não foi observada acidificação do meio de cultivo contendo *n*-hexadecano.

Uma hipótese que poderia ser levantada seria que o glicerol propiciou a formação de outros metabólitos pela cepa de *Rhodococcus*, como ácidos orgânicos, que alteraram o pH do meio.

A produção de biossurfactantes por *Rhodococcus* sp em fontes hidrofóbicas foi relatada em muitos trabalhos e poucos são os que sugerem o uso de fontes hidrofílicas como melhor substrato para a produção. O resultado obtido neste trabalho mostrou que o uso do glicerol apresentou a vantagem de promover a produção de um biossurfactante extracelular. Em termos tecnológicos isto seria economicamente mais viável comparado ao processo de recuperação do biossurfactante aderido à parede celular, o qual necessitaria de uma etapa adicional para sua liberação e posterior recuperação.

O fato do glicerol purificado ser utilizado como fonte de carbono na produção do biossurfactante vislumbra a possibilidade do uso da glicerina bruta (oriunda da obtenção do biodiesel) como fonte de carbono em substituição ao glicerol purificado. No processo de produção de biodiesel, a obtenção de um litro do combustível tem como contrapartida a formação de aproximadamente

100 mL de glicerina bruta. Em 2008, com a obrigatoriedade da mistura de 2% do combustível ecológico ao óleo diesel convencional, estima-se que o volume de glicerina produzido em escala nacional será da ordem de 80.000 toneladas de glicerina bruta por ano, que deve ser considerada como excedente de produção, visto que o consumo nacional atinge aproximadamente 14.080 ton/ano (ABIQUIM. Anuário 2004). O uso desta glicerina na produção de biossurfactante seria uma das alternativas para o aproveitamento dessa matéria-prima.

Pelas razões expostas acima, optou-se pelo uso do glicerol como fonte de carbono para continuidade do estudo de produção do biossurfactante.

Desta forma, houve a necessidade de sanar o problema da manutenção do pH do meio de cultivo, nos experimentos realizados em frascos agitados.

Sabendo-se que qualquer alteração no meio de cultura poderia interferir na atividade tensoativa do biossurfactante, estudou-se a adição do tampão citrato pH 7 no meio de cultura em substituição ao tampão fosfato. O pH foi acompanhado durante o processo de produção e foi verificado que, em 2 dias de incubação, os valores de pH do meio também diminuíram, variando de 4,0 a 5,5.

Assim, foi necessário utilizar o biorreator instrumentado para garantir a manutenção do pH e não comprometer a produção do biossurfactante.

Desta forma, uma mudança de estratégia na condução dos experimentos de otimização da produção do biossurfactante foi realizada.

No levantamento bibliográfico, descrito no item 2.9.1, observou-se pouca informação disponível sobre otimização da produção de biossurfactante por *Rhodococcus* sp. Assim, neste trabalho, a inclusão de uma metodologia de investigação de diversas variáveis (fontes de nitrogênio, elementos traços, fontes de carbono alternativas (resíduos), razão C/N, sais minerais, pH e temperatura), as quais pudessem influenciar a produção do tensoativo, ficou prejudicada devido ao uso do biorreator. Neste caso, apenas uma variável poderia ser investigada em cada corrida do biorreator, prolongando muito o tempo de estudo destas variáveis. Desta forma, os experimentos de avaliação

da produção do biossurfactante precisaram ser redimensionados e optou-se pela redução das variáveis estudadas. Definiu-se assim que seriam estudadas, separadamente, influência da temperatura, as fontes de nitrogênio (nitrato de sódio, sulfato de amônio e ambas) e a razão C/N em biorreator de bancada, estabelecendo-se os perfis cinéticos para cada condição imposta.

Considerando que a acidificação do meio de cultura nos experimentos em frascos agitados pudessem ter comprometido a produção obtida, foram realizados ensaios em biorreator empregando-se 1% de *n*-hexadecano e 2 % de glicerol, a temperatura de 28°C, para validação dos resultados.

Os resultados finais, obtidos após 4 dias de processo, confirmaram os resultados encontrados nos experimentos em frascos agitados, conforme mostrado na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Concentração de biossurfactante (em g/L) obtida no experimento em biorreator antes e após sonicação do meio fermentado.

Fonte de carbono	Tratamento (Sonicação)	
	Antes	Após
<i>n</i> -hexadecano 1%	0,30 ± 0,03	1,0 ± 0,4
glicerol 2%	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,5

Nota-se que a concentração do biossurfactante obtida no experimento realizado em biorreator foi maior, comparado ao experimento em frasco agitado (Tabela 5.1). Isto ocorreu, provavelmente, pelo controle do pH e da oxigenação ocorrida no biorreator, permitindo melhor condição para produção do biossurfactante. Apesar da maior concentração, os resultados de produção de biossurfactante em biorreator validaram os resultados iniciais, em frascos agitados, e definiu-se que o glicerol seria utilizado como fonte de carbono para produção de biossurfactante por *Rhododoccus erythropolis*.

5.1.2 Influência da Temperatura

A temperatura é uma variável importante que deve ser analisada em processos biotecnológicos, uma vez que interfere nas reações enzimáticas envolvidas no metabolismo bacteriano. A temperatura de 28°C foi escolhida por estar próxima às temperaturas que resultaram em melhor produção de biossurfactante por *Rhodococcus* sp; e a temperatura de 37°C, foi a melhor temperatura encontrada para produção de biossurfactante de *Rhodococcus* sp segundo BICCA e col. (1999).

A Figura 5.1 mostra o crescimento celular, o consumo de glicerol e a síntese de biossurfactante a uma temperatura de 28°C.

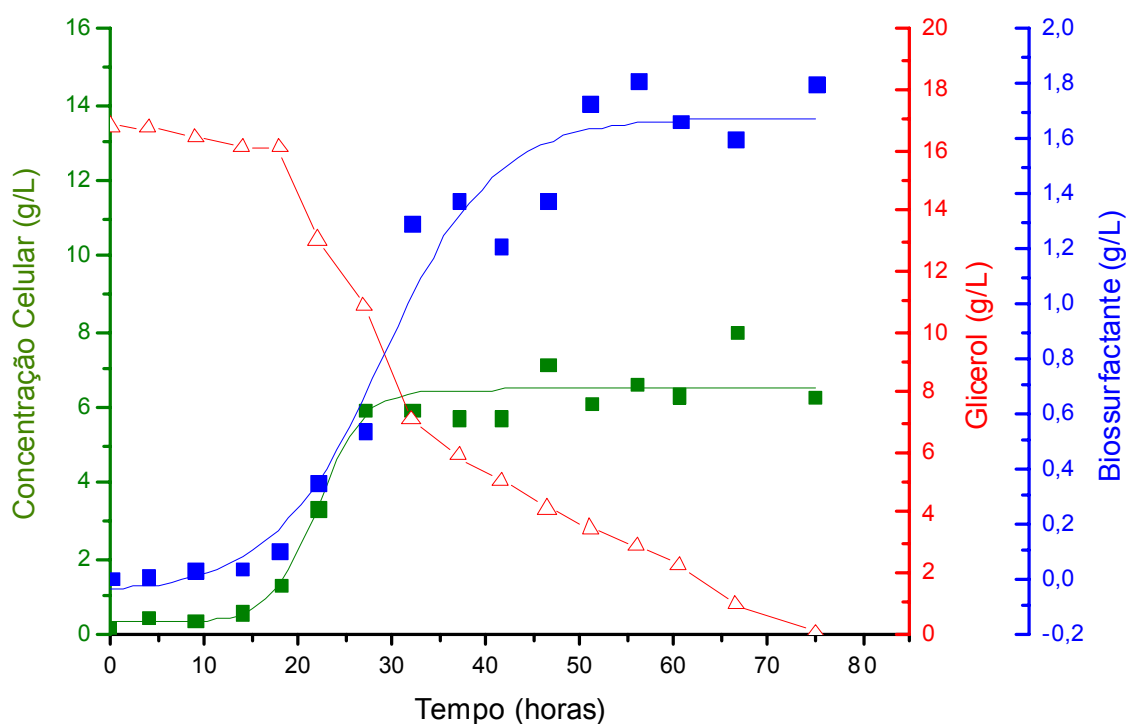


Figura 5.1 – Perfil cinético do bioprocessamento evidenciando o crescimento celular, o consumo de glicerol e a produção de biossurfactante a 28°C.

O crescimento exponencial iniciou-se aproximadamente após 14 h com taxa de crescimento específica (μ_x) de $0,184 \text{ h}^{-1}$, correspondendo a um tempo de geração de 3,8 h. A fase lag de 14 horas pode ser devido a agregação celular observada no início do experimento. A produção do biossurfactante começou no início da fase exponencial e foi mantida até a fase estacionária, apresentando um perfil típico de uma produção semi-associada ao crescimento. A concentração do biossurfactante aumentou, aproximadamente, 3 vezes durante a fase estacionária, acumulando 1,7 g/L após 51 h, o qual corresponde a uma produtividade volumétrica (Q_P) de 33 mg/L.h e rendimento de produto por célula (g biossurfactante/ g célula - $Y_{P/X}$) de 0,28 g/g. O rendimento de produto por substrato (g biossurfactante/ g substrato - $Y_{P/S}$) foi 0,13 g/g.

O meio fermentado livre de células apresentou tensão superficial e interfacial (com hexadecano) de $43,1 \pm 3,2$ e $15,0 \pm 1,3$ mN/m, respectivamente, e Índice de Emulsificação (E_{24}) para o sistema binário hexadecano-água de 67%.

A Figura 5.2 mostra o crescimento celular, consumo de glicerol e a síntese de biossurfactante a uma temperatura de 37°C.

Pode-se observar que o tempo total do experimento foi de 24 horas. A fase lag teve duração de aproximadamente 2,5 h, quando se iniciou a fase exponencial, atingindo a concentração celular máxima (6,0 g/L) em 10 h de cultivo. Pelas curvas de crescimento e produção de biossurfactante nota-se que, nestas condições empregadas, a produção foi associada ao crescimento.

O meio fermentado livre de células apresentou tensão superficial e interfacial (com hexadecano) de $40,3 \pm 2,1$ e $13,0 \pm 1,2$ mN/m, respectivamente, e Índice de Emulsificação (E_{24}) para o sistema binário hexadecano-água de 60%, indicando atividade tensoativa do biossurfactante produzido.

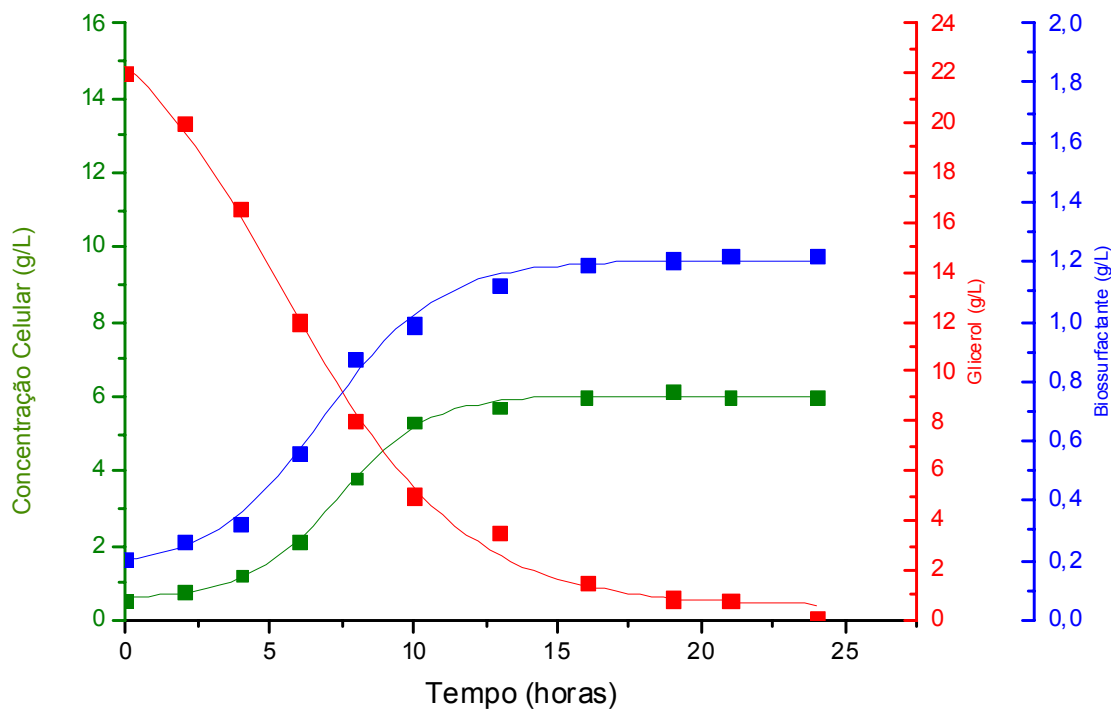


Figura 5.2 – Perfil cinético do bioprocesso mostrando crescimento celular, consumo de glicerol e produção de biossurfactante a 37°C.

A partir dos resultados, pode-se estabelecer uma comparação entre os parâmetros dos experimentos realizados em reator a 28°C e a 37°C, apresentados na Tabela 5.3.

Nota-se que a temperatura de 37°C alterou os parâmetros do bioprocesso. Pelos valores de μ_x e tempo de geração, o crescimento da bactéria foi acelerado e o tempo de cultivo reduzido. A concentração do produto foi menor; no entanto, a redução do tempo de cultivo resultou em um aumento da produtividade, em até 2,3 vezes. O rendimento de produto/célula ($Y_{P/X}$) foi praticamente o mesmo e a conversão do substrato a produto ($Y_{P/S}$) foi reduzida.

Tabela 5.3 – Parâmetros do bioprocesso realizados a 28° e 37°C.

Parâmetros	Temperatura	
	28°C	37°C
Taxa específica de crescimento (h ⁻¹)	0,184	0,252
Tempo de geração (h)	3,8	2,7
Produção do biossurfactante (g/L) (meio fermentado)	1,70 ± 0,2	1,22 ± 0,05
Y _{P/X} (g de produto/g de célula)	0,28	0,24
Y _{P/S} (g de produto/g de substrato)	0,131	0,058
Q_P (mg/L.h)	33	75
Tensão Superficial (mN/m)	43,1 ± 3,2	40,3 ± 2,1
Tensão Interfacial (mN/m)	15,0 ± 1,3	13,0 ± 1,2
Índice de Emulsificação (%)	67	60

O aumento da produtividade a 37°C foi determinante para se estabelecer a temperatura de trabalho, uma vez que este parâmetro é fundamental na viabilidade de processos biotecnológicos.

No trabalho de BICCA e col. (1999), foram avaliadas diferentes temperaturas. Os autores verificaram que na temperatura de 37°C obteve-se a melhor atividade emulsificante do biossurfactante produzido por *Rhodococcus ruber* que foi de 63%.

Cabe aqui ressaltar algumas observações realizadas durante as fermentações: i) houve pouca formação de espuma (Figura 5.3 A), uma vez que a oxigenação foi realizada pela parte superior do reator (tampa), que permitiu aeração suficiente para manter 20% de saturação de oxigênio no meio de cultura, sendo uma vantagem quando comparado a biossurfactantes produzidos por outros microrganismos; ii) houve elevada injeção de solução básica 4 mol/L NaOH (25 mL) para manter o pH 7 do meio de cultivo; iii) no início da fermentação ocorreu adesão de células na parede do vaso do reator que, no decorrer do experimento, se desprenderam.

A Figura 5.3 B mostra as colônias de *Rhodococcus erythropolis* após fermentação conduzida a 37°C. Nota-se o aspecto mucóide das colônias e ausência de pigmentação, diferentemente da morfologia das colônias mostradas na Figura 4.1, as quais apresentaram colônias rosadas com bordas irregulares.



(A)



(B)

Figura 5.3 – (A) Fermentação realizada a 37°C e (B) Colônias de *Rhodococcus erythropolis* após a fermentação, crescidas em meio TSA.

IWABUCHI e col. (2000) descreveram o aspecto mucóide em colônias de *Rhodococcus rhodochrous* e relacionaram esta morfologia pela presença de exopolissacarídeos (EPS) formados pelas células. Posteriormente, os autores deram continuidade aos estudos e elucidaram a função do EPS produzido por esta cepa (IWABUCHI e col., 2003). Neste trabalho, os autores relataram que algumas espécies de *Rhodococcus* sofrem mudanças na morfologia de suas colônias, de irregulares para mucóides e vice-versa, durante cultivo em determinadas condições. Esse fenômeno estaria relacionado com alterações nas propriedades da superfície celular, influenciando na capacidade de adesão da bactéria. Os autores sugerem que a presença do EPS afetaria a

hidrofobicidade da superfície celular de *Rhodococcus*, tornando-a mais hidrofílica, uma vez que estas apresentam alta hidrofobicidade decorrente da predominância de ácido micólico na sua parede celular, impedindo as interações hidrofóbicas que ocorrem na célula-substrato. Além disto, interações hidrofóbicas célula-célula seriam dificultadas evitando a agregação celular, fenômeno este observado em células de *Rhodococcus*. Por fim, concluíram que a produção de EPS hidrofílico em *Rhodococcus* é ecologicamente importante, permitindo a adaptação destas bactérias nos diversos nichos ecológicos.

5.1.3 Influência da Fonte de Nitrogênio

Nestes experimentos foi utilizado o nitrato de sódio em substituição ao nitrato de potássio. O extrato de levedura foi retirado do meio de cultivo de modo a possibilitar a quantificação do nitrogênio, uma vez que não é precisa a concentração de nitrogênio neste composto. Cabe ressaltar que a razão C/N foi mantida em 14, como no início dos experimentos, e a quantificação do biossurfactante foi realizada após a recuperação deste do meio fermentado (biossurfactante bruto).

Os perfis cinéticos de crescimento microbiano, produção de biossurfactante bruto e consumo dos substratos nas diferentes fontes de nitrogênio estão representados na Figura 5.4. Nota-se que, no gráfico A, no qual foi utilizado o sulfato de amônio, a maior concentração do biossurfactante (0,16 g/L) e de concentração celular (2,35 g/L) foi atingida em torno de 15 horas de cultivo e a produção do biossurfactante foi associada ao crescimento. Após 15 horas de cultivo, não houve variação nestas concentrações mesmo que o consumo de glicerol e de sulfato de amônio tenham sido continuados até 24 horas de fermentação. A bactéria consumiu apenas 35% do glicerol e 80% do sulfato de amônio disponíveis até atingir a maior concentração do biossurfactante.

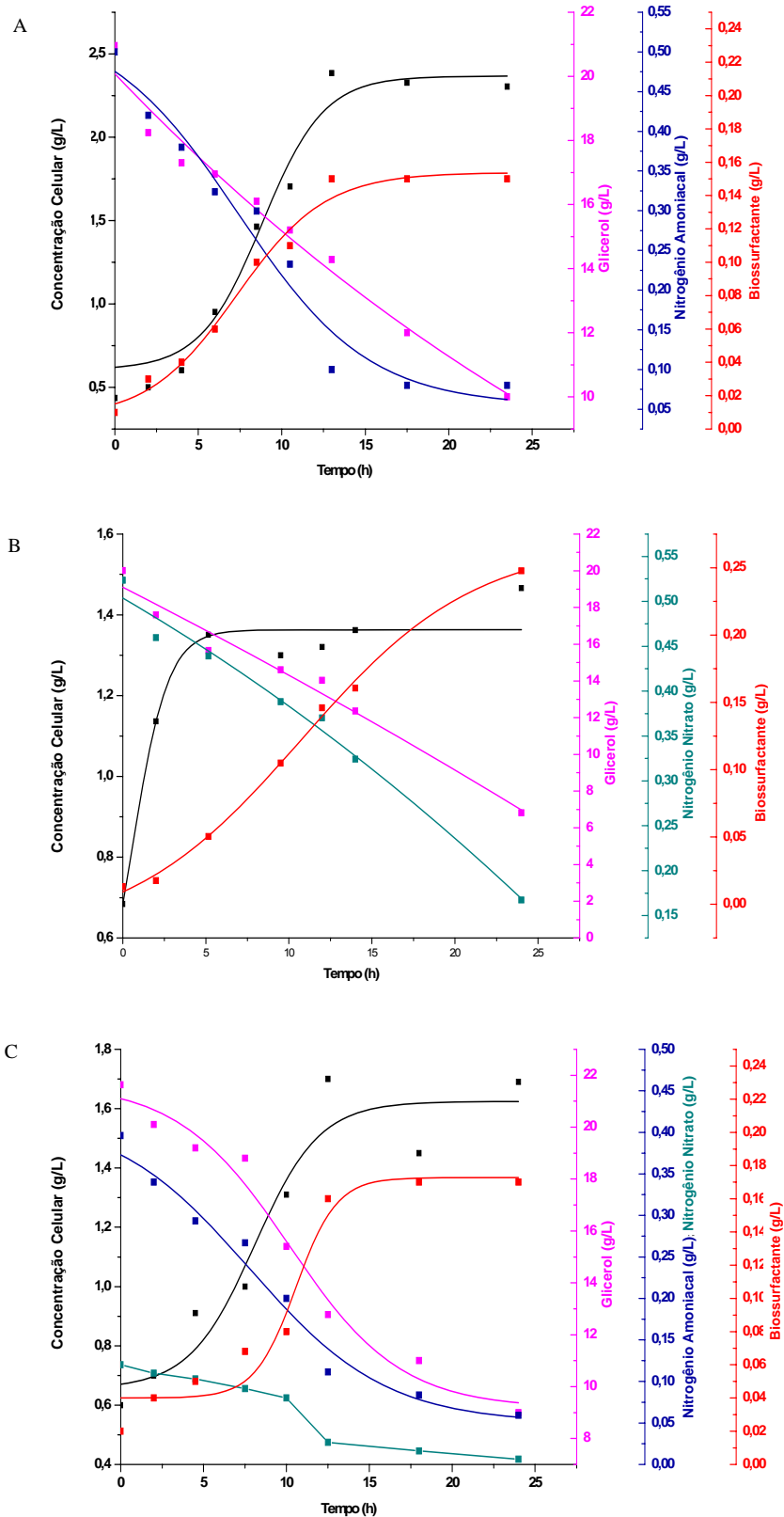


Figura 5.4 - Perfis cinéticos dos bioprocessos realizados em biorreator com 2% glicerol, a 37°C, variando-se as fontes de nitrogênio, mantendo a razão C/N de 14. A) Sulfato de Amônio; B) Nitrato de Sódio; C) Sulfato de Amônio e Nitrato de Sódio.

No gráfico B, onde o processo foi conduzido com nitrato de sódio, verifica-se que a concentração celular foi de 1,35 g/L nas primeiras 5 horas de fermentação, quando o microrganismo entrou na fase estacionária de crescimento. No entanto, a produção do biossurfactante se estendeu até 24 horas de experimento, alcançando uma concentração de 0,25 g/L. Nota-se assim, uma alteração do perfil cinético em relação ao gráfico A, visto que a produção foi do tipo semi-associada ao crescimento. A redução percentual do substrato foi de 68% de glicerol e de 66% de nitrogênio durante a produção do biossurfactante.

No experimento com as duas fontes de nitrogênio (gráfico C), condição inicial do meio de cultivo, houve uma produção próxima de 0,18 g/L de biossurfactante e de 1,6 g/L da concentração celular em 15 horas. A produção foi associada ao crescimento. Nota-se que a fonte de nitrogênio amoniacal foi consumida, preferencialmente, nas primeiras horas do experimento, sendo que o consumo do nitrogênio presente no nitrato de sódio foi mais acentuado depois que mais de 60% do nitrogênio amoniacal foi consumido, e coincidiu com o aumento da concentração do biossurfactante. Houve um consumo de 43% do glicerol disponível, 91 % do nitrogênio do nitrato de sódio e 81% do nitrogênio amoniacal durante a produção do biossurfactante.

A Figura 5.5 evidencia o efeito das fontes de nitrogênio na produção do biossurfactante e no fator de rendimento em produto por célula ($Y_{P/X}$) do bioprocesso. Nota-se que a produção do biossurfactante foi maior na condição de nitrato de sódio. Destaca-se, ainda, um aumento relevante do $Y_{P/X}$ nesta condição (de 0,08 para 0,33 g/g). Isto é um indicativo que, nesta condição, houve maior capacidade produtora do microrganismo e que o glicerol consumido como substrato foi, preferencialmente, utilizado para produção do biossurfactante, diminuindo desperdício do substrato.

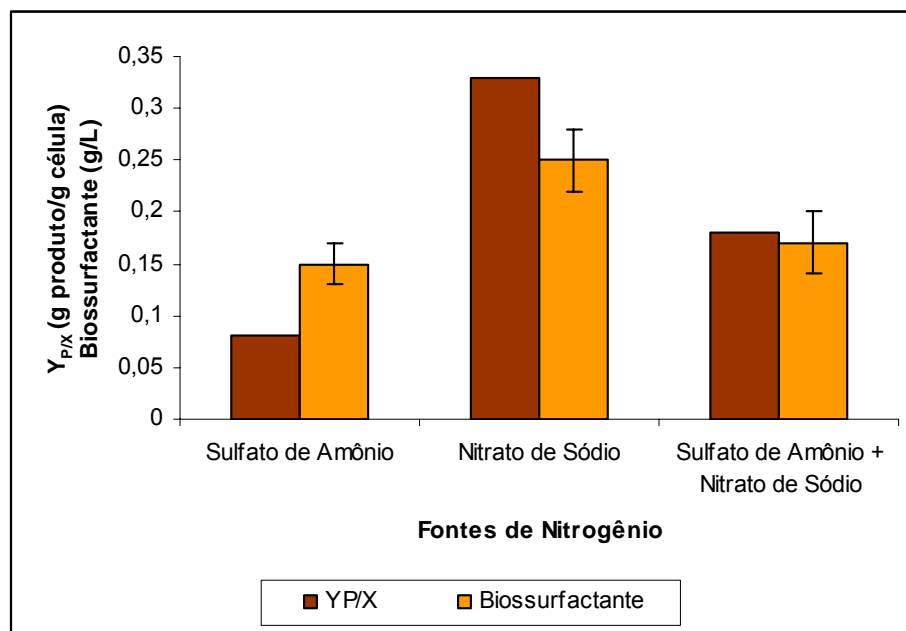


Figura 5.5 – Efeito das diferentes fontes de nitrogênio na produção do biossurfactante e no fator de rendimento em produto por célula ($Y_{P/X}$).

Na Tabela 5.4 estão apresentados o fator de conversão de substrato a produto, a produtividade volumétrica do bioprocesso e a redução percentual dos substratos. Nota-se que Q_P foi praticamente a mesma nas três condições estudadas e o fator de conversão substrato a produto foi discretamente maior na condição de nitrato de sódio ($Y_{P/S} = 0,021$ g/g). Quanto à redução percentual dos substratos durante a produção do biossurfactante verificou-se que houve grande variação nos valores referentes ao glicerol, com baixo consumo deste nos experimentos A e C. Pela Figura 5.4, nota-se que o glicerol continuou a ser consumido após cessar a produção do biossurfactante, o que sugere que o glicerol foi utilizado para gerar outros metabólitos que não eram de interesse.

Tabela 5.4 – Parâmetros do bioprocesso realizado em biorreator, a 37°C, em diferentes fontes de nitrogênio.

Parâmetros do Processo	Sulfato de Amônio (A)	Nitrato de Sódio (B)	Sulfato de Amônio + Nitrato de Sódio(C) *
$Y_{P/S}$ (g produto/g substrato)	0,018	0,021	0,018
Q_P (mg/L.h)	11	10	12
RPS (%) Nitrogênio	80	66	81 (nitrogênio amoniacal) 91 (nitrato de sódio)
RPS (%) Glicerol	35	68	43

* fontes de nitrogênio utilizadas no meio de cultivo dos experimentos iniciais.

RPS: Redução Percentual de Substrato

No estudo realizado por ESPUNY e col. (1996) foi verificada a influência das fontes de nitrogênio nitrato de sódio e sulfato de amônio na produção de glicolípido por *Rhodococcus erythropolis*. Diferentes concentrações destas fontes foram estudadas e a melhor produção foi atingida com nitrato de sódio na concentração de 2,5 g/L. Pela cinética de produção do biossurfactante foi verificada uma produção associada ao crescimento. No entanto, ao contrário do que foi obtido nestes ensaios, a produção teve início quando o nitrato de sódio estava exaurido.

A notável diferença entre os fatores de rendimento em produto por concentração celular dos experimentos com diferentes fontes de nitrogênio pode ser elucidada pelas diferentes formas de metabolismo que a bactéria exerce na presença destas. O íon amoniacal é a fonte de nitrogênio preferencial para crescimento microbiano, resultando em maiores taxas de crescimento comparado a outras fontes de nitrogênio. Isto pode ser verificado na Figura 5.4, no gráfico A, no qual a concentração celular atingiu maior concentração celular, que foi de 2,35 g/L, e no gráfico C, no qual o consumo de amônio foi preferencial ao nitrato.

Na presença de altas concentrações deste soluto, ocorre uma rápida difusão deste através da membrana citoplasmática para o interior do citosol, promovendo o crescimento celular. Somente quando esta difusão torna-se

limitante, inicia-se um transporte ativo deste soluto. Uma vez presente no citosol, o nitrogênio amoniacal é assimilado na forma de glutamato, disponível para as reações de biossíntese celular (MERRICK e EDWARDS, 1995; BURKOVSKI, 2003). Contrariamente, o metabolismo de nitrato é mais complexo, pois para a sua assimilação é necessária uma redução a amônio, que ocorre em algumas etapas mediadas por enzimas específicas.

Assim, pelos resultados obtidos, o nitrato de sódio foi a fonte de nitrogênio que possibilitou a maior produção do biossurfactante e o maior rendimento em produto por concentração celular.

Nesta etapa do trabalho, foi verificado um acréscimo de 39% na concentração do biossurfactante, utilizando nitrato de sódio, em relação à obtida na condição inicial do meio de cultivo, utilizando-se sulfato de amônio e nitrato de sódio.

5.1.4 Estudo da Razão C/N na Produção do Biossurfactante

Uma vez definida a fonte de nitrogênio que propiciou melhor produção de biossurfactante, foi avaliada a razão C/N, a fim de estabelecer as proporções ideais entre as fontes de carbono e nitrogênio para a produção do bioproduto.

A razão C/N 14 foi estudada, pois esta razão foi a utilizada no meio de cultivo basal (adaptado de PHILP e col., 2002) no início dos experimentos. A partir deste valor de C/N, foram realizados os experimentos com altas e baixas concentrações de nitrogênio (C/N 5 e C/N 40, respectivamente).

Na Figura 5.6 estão os gráficos dos perfis cinéticos de produção do biossurfactante nas condições ensaiadas. Nota-se a produção semi-associada ao crescimento em todas as condições.

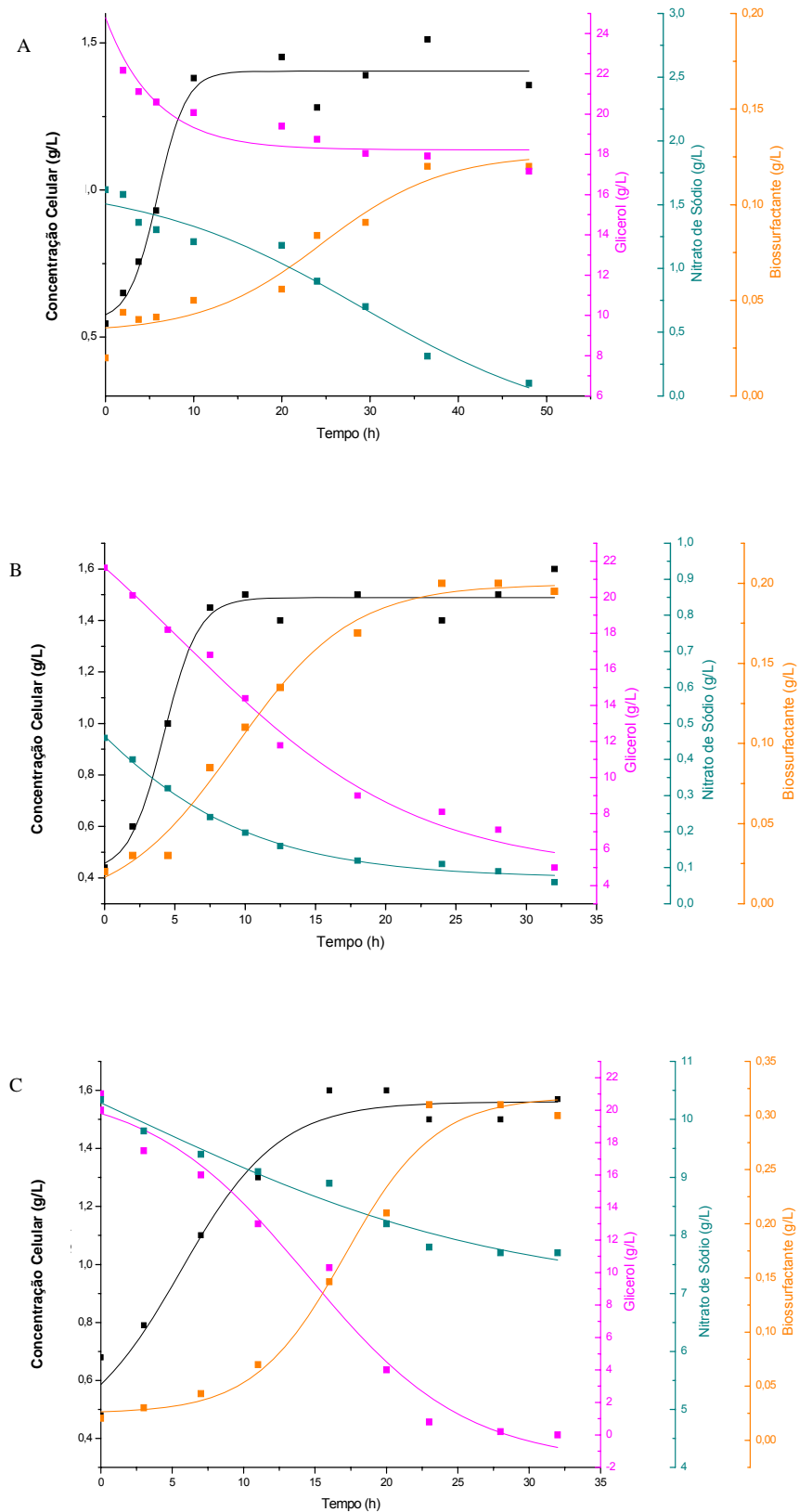


Figura 5.6 – Perfis cinéticos dos bioprocessos realizados em condições diferentes de C/N. A) C/N 40; B) C/N 14; C) C/N 5.

O gráfico A representa o perfil cinético da produção de biossurfactante em C/N 40. O crescimento microbiano cessou com apenas 10 horas de fermentação e a produção do bioproduto foi máxima ($0,12 \pm 0,02$ g/L) após 36 horas. O consumo do glicerol foi de apenas 28% permanecendo sua concentração elevada ao final do processo, e o nitrato foi consumido em quase sua totalidade em 48h de experimento.

No gráfico B, no qual está representado o perfil cinético do experimento em C/N 14, foi verificado rápido crescimento celular atingindo a fase estacionária em, aproximadamente, 6 horas de processo. Nota-se um aumento do consumo de glicerol e uma contínua formação do produto mesmo após o crescimento celular ter alcançado a fase estacionária, atingindo produção de 0,21 g/L em 24 horas. Verificou-se um consumo de 66% de glicerol e 77% do nitrato de sódio.

O gráfico C apresenta o perfil cinético do experimento realizado na razão C/N 5. Foi observado que foi necessário maior tempo para o microrganismo atingir a fase estacionária (15 horas) e o máximo da produção foi 0,31 g/L em 24 horas de processo. Verificou-se que o consumo do glicerol aumentou na medida em que o bioproduto foi formado sendo que, em 24 horas de fermentação, o glicerol foi exaurido, em uma taxa de consumo de 1g/L.h. O consumo de nitrato foi de apenas 25%.

Pelo gráfico da Figura 5.7 ficou evidente que a alta concentração de nitrogênio, referente a C/N 5, favoreceu a produção do biossurfactante e a produtividade volumétrica do processo.

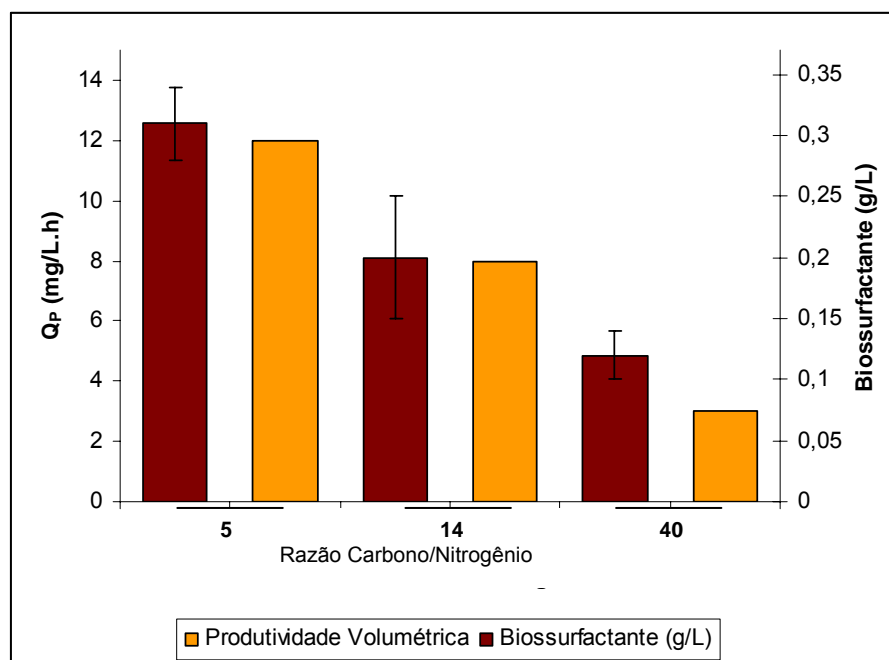


Figura 5.7 – Efeito da razão C/N na produção do biossurfactante e produtividade volumétrica do processo.

Na Tabela 5.5 estão apresentados o fator de conversão de substrato a produto e o fator de conversão de célula a produto, além da redução percentual dos substratos. Nota-se que os valores de $Y_{P/S}$ e $Y_{P/X}$ foram muito próximos, não sendo evidenciada acentuada influência da razão C/N nestes parâmetros. Quanto a redução dos substratos, nota-se que na condição de C/N 5 houve consumo total do glicerol e pouco consumo da fonte de nitrogênio, o que possibilitaria a realização de experimentos em batelada alimentada apenas de glicerol, numa tentativa de se incrementar a produção do biossurfactante. Na C/N 40 houve o consumo total da fonte de nitrogênio com baixíssimo consumo de glicerol o que resultou em baixa produção. Isto sugere que a produção deste biossurfactante não está relacionada com uma condição limitante de nitrogênio para esta linhagem.

Tabela 5.5 – Parâmetros estimados dos experimentos realizados em biorreator, a 37°C, em diferentes razão C/N.

Parâmetros do Processo	C/N 5	C/N 14	C/N 40
$Y_{P/S}$ (g produto/g substrato)	0,016	0,013	0,017
$Y_{P/X}$ (g produto/g célula)	0,3	0,2	0,3
RPS (%) Nitrato de Sódio	25	77	99
RPS (%) Glicerol	100	66	28

RPS – Redução Percentual do Substrato

Alguns relatos da literatura indicam que a produção de biossurfactante é desencadeada em condição limitante de nitrogênio. Pode-se destacar os trabalhos de SANTOS e col., (2002), no qual obtiveram maior concentração de raminolipídeos de *Pseudomonas aeruginosa* em meio de cultivo contendo glicerol e nitrato de sódio na razão C/N 40; e, no estudo feito por WU e col. (2008) a razão C/N ótima para a produção de raminolipídeos mostrou variar significativamente, de acordo com a fonte de carbono utilizada em experimentos realizados com *Pseudomonas aeruginosa* cepa EM1. A melhor razão C/N foi 26 e 52, para culturas contendo glicose e glicerol como única fonte de carbono, respectivamente.

Diferentemente, neste trabalho, a maior razão C/N (40) foi a condição que menos favoreceu a produção do tensoativo por *Rhodococcus erythropolis*.

Na condição de C/N 5 foi obtida maior concentração do biossurfactante, próxima a utilizada no trabalho de ESPUNY e col., (1996), no qual a razão C/N 8 promoveu a maior produção do biossurfactante (2,74 g/L) por *Rhodococcus erythropolis*.

SINGER e col. (1990) obtiveram maior produção de biossurfactante (0,49 g/L) quando *Rhodococcus erythropolis* foi crescida em meio contendo hexadecano e sulfato de amônio em uma C/N de 3,4.

Os resultados deste trabalho mostraram que para glicerol, empregando-se nitrato de sódio como única fonte de nitrogênio, na razão C/N 5, a concentração do biossurfactante praticamente dobrou comparado ao meio de cultivo original, no qual se utilizaram sulfato de amônio e nitrato de sódio na razão C/N 14 (de 0,17 g/L para 0,31 g/L).

5.1.5 Produção de Biossurfactante em Batelada Alimentada por Pulsos

O gráfico da Figura 5.8 apresenta o perfil cinético do bioprocessamento conduzido em batelada alimentada por pulsos de glicerol.

Neste experimento, o inóculo foi de $1,71 \pm 0,06$ g/L, mais que o dobro dos inóculos dos experimentos anteriores. Nota-se o início da fase estacionária de crescimento em 6 horas e consumo de glicerol, em quase sua totalidade, em 20 horas de fermentação. Analisando-se os parâmetros do processo nesta fase, antes da alimentação, a produção do biossurfactante foi de $0,45 \pm 0,02$ g/L, a concentração celular foi de $3,5 \pm 0,08$ g/L, resultando em $Y_{P/S}$ de 0,021 g/g, $Y_{P/X}$ de 0,23 g/g, Q_P de 22 mg/L.h e taxa de consumo de glicerol de 1,04 g/L.h. A produtividade, praticamente, dobrou em relação ao processo em batelada simples (Q_P de 12 mg/L.h), nas mesmas condições de cultivo. Isto era esperado com o aumento da concentração do inóculo.

Com o glicerol exaurido, após 20 horas de processo, iniciou-se a alimentação por pulsos de glicerol até atingir a concentração de 3,5 g/L. Em 33 horas de processo, a concentração de biossurfactante foi máxima, alcançando uma concentração de $0,97 \pm 0,05$ g/L e produtividade volumétrica de 30 mg/L.h, após quatro pulsos de alimentação. A produção do biossurfactante foi semi-associada ao crescimento, no entanto, na fase de condução por batelada alimentada foi totalmente não associada ao crescimento. Nota-se que, depois de 33 horas, com mais um pulso de alimentação, não houve alteração na produção do biossurfactante com baixo consumo de glicerol até cessar em 40 horas de fermentação. Isto pode ser devido à formação de outros metabólitos e

da formação de sais devido a adição elevada de solução básica para manter o pH neutro, que prejudicaria o metabolismo celular, cessando sua produção.

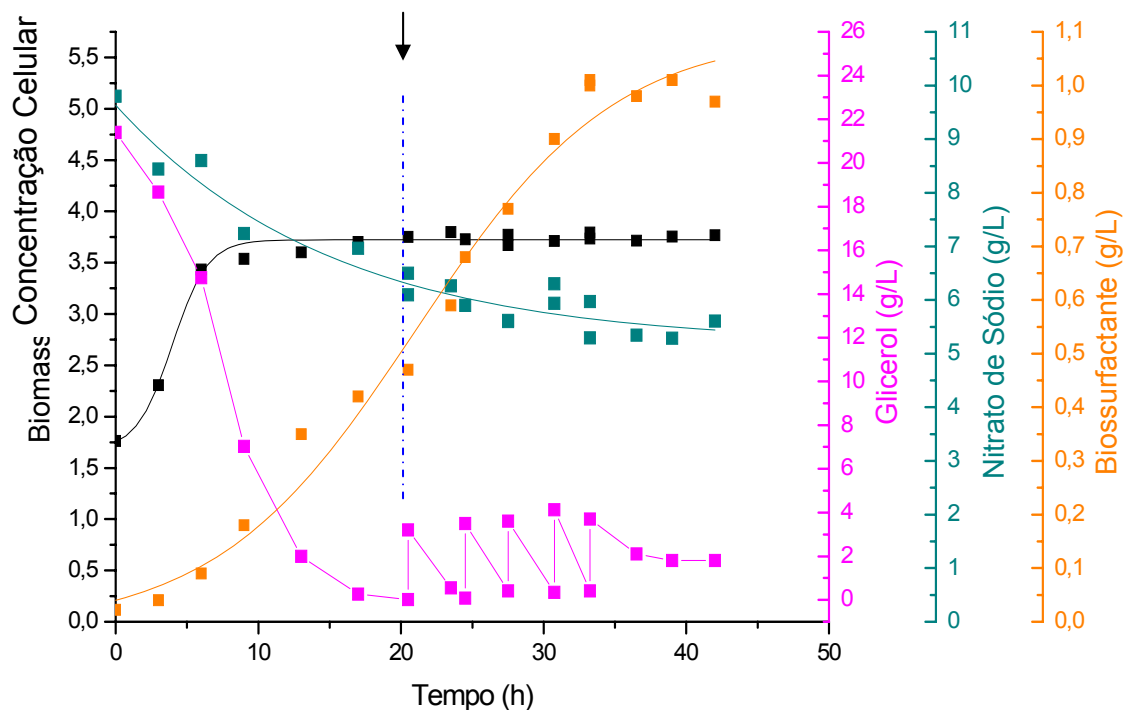


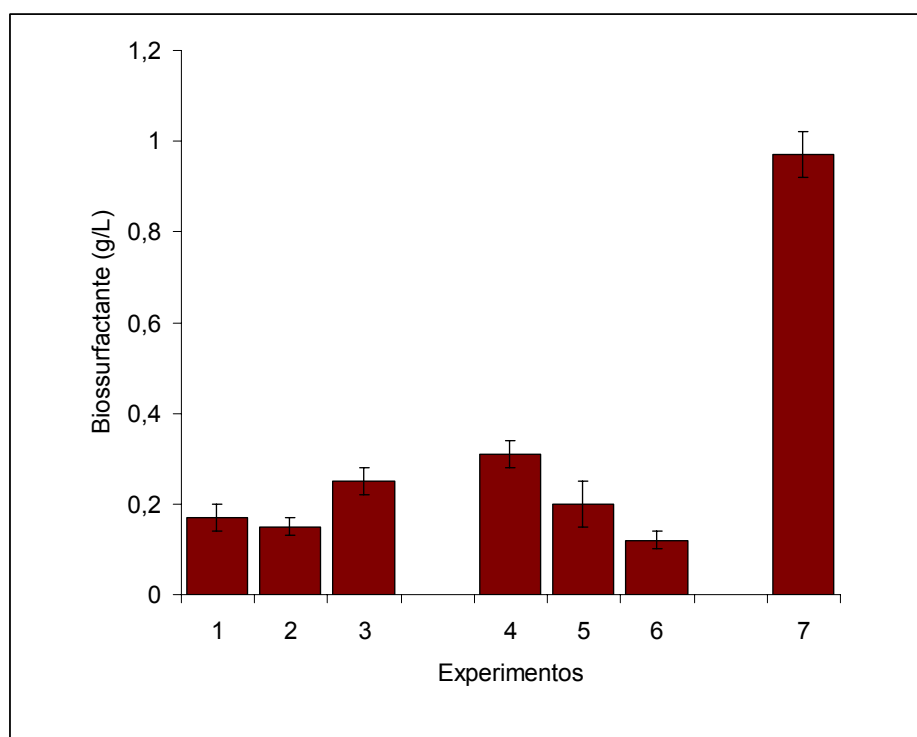
Figura 5.8 – Perfil cinético do bioprocessamento conduzido em batelada alimentada de glicerol, C/N 5, a 37°C. A seta indica o início da alimentação no processo.

O consumo de nitrato foi pouco, permanecendo em concentração suficiente para alimentação apenas da fonte de carbono.

5.1.6 Evolução dos Resultados da Produção de Biossurfactante por *Rhodococcus erythropolis* em Biorreator de Bancada

No gráfico da Figura 5.9, evidencia-se o aumento da concentração do biossurfactante ao longo dos experimentos realizados. A produção dobrou com a substituição das fontes de nitrogênio do meio de cultivo basal (sulfato de amônio + nitrato de sódio) para nitrato de sódio apenas, e com a alteração da razão C/N de 14 para 5. Entretanto, a concentração do biossurfactante foi

efetivamente aumentada quando o experimento foi conduzido em batelada alimentada por pulsos de glicerol, obtendo-se uma produção de, aproximadamente, $0,97 \pm 0,05$ g/L do tensoativo com produtividade volumétrica de 30 mg/L.h. Isto equivale dizer que houve um incremento de 6 vezes na produção do biossurfactante e aumento de 2,5 vezes na produtividade volumétrica, no final deste trabalho. Ficou claro que o modo de condução do bioprocessamento foi essencial para melhorar a produção do biossurfactante estudado e sua produtividade volumétrica.



1 - Sulfato de Amônio + Nitrato de Sódio (condição inicial)
 2 - Sulfato de Amônio
 3 - Nitrato de Sódio
 4 - C/N 5
 5 - C/N 14
 6 - C/N 40
 7 - batelada alimentada

Figura 5.9 – Produção do biossurfactante obtida nos estudos da fonte de nitrogênio (1, 2 e 3); razão C/N (4, 5 e 6) e batelada alimentada (7).

5.2 Recuperação do Biossurfactante do Meio Fermentado Livre de Células

Neste ensaio o meio fermentado livre de células foi concentrado para aumentar a possibilidade de recuperação do biossurfactante, uma vez que podem ocorrer perdas neste processo. A concentração dos açúcares totais obtidos neste sobrenadante concentrado foi de $2,54 \pm 0,29$ g/L. Após as extrações a concentração obtida do biossurfactante foi de $1,11 \pm 0,04$ g/L de açúcar no precipitado formado na extração por etanol (-4°C) 95% (10:1), correspondendo a uma recuperação de 44% do sobrenadante concentrado (Figura 5.10) e de $0,15 \pm 0,04$ g/L de açúcares na fase orgânica da extração por clorofórmio/metanol, correspondendo a 6% do sobrenadante concentrado.

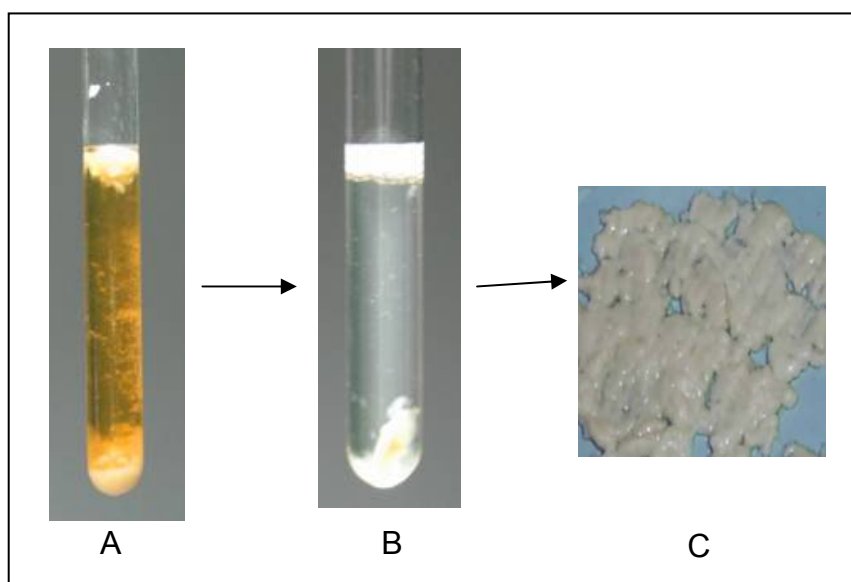


Figura 5.10 - Precipitação de biossurfactante com etanol (-4°C) 95%.
A) precipitação do biossurfactante com etanol (-4°C) 95% no meio fermentado;
B) precipitação do biossurfactante após lavagem com etanol (-4°C) 95%;
C) precipitado isolado.

A propriedade tensoativa dos biossurfactantes recuperados foi comprovada pelo Índice de Emulsificação de 60% e tensão superficial de 43 mN/m para o biossurfactante precipitado em etanol e, E_{24} de 10% para o resíduo obtido na extração por clorofórmio. A tensão superficial deste resíduo diluído em água não foi verificada devido o volume insuficiente para determinação dessa medida em Tensiômetro.

Conforme descrito na seção 2.6, a metodologia de extração por clorofórmio/metanol é apropriada para recuperação de biossurfactantes do tipo

glicolípido e a extração por etanol é apropriada para recuperar biossurfactantes poliméricos como complexos de polissacarídeos/proteína e/ou polissacarídeos/ácido graxo. Pelos resultados de recuperação do biossurfactante obtidos neste ensaio, pode-se sugerir que, utilizando-se glicerol como fonte de carbono, a 37°C, houve produção de uma mistura de biossurfactantes, no qual foi verificada a prevalência da produção de um biossurfactante polimérico, podendo ser formado por um complexo de polissacarídeo/proteína ou polissacarídeo/ácido graxo, por exemplo.

No trabalho de RAPP e col. (1979a), os autores observaram que, quando *R. erythropolis* foi crescida em 2% de glicerol, a 30°C, foram obtidas concentrações de 0,8 g/L de biossurfactante extraído por clorofórmio/metanol e, quando foram crescidas em n-alcenos, a concentração do biossurfactante extraído foi de 2,1 g/L. Já ESPUNY e col. (1996), os quais realizaram experimento semelhante com *R. erythropolis*, obtiveram uma concentração de 0,18 g/L de biossurfactante produzido em glicerol após recuperação por clorofórmio/metanol e 3,2 g/L de biossurfactante produzido em n-alceno e recuperado da mesma maneira. Os biossurfactantes obtidos nos dois trabalhos foram caracterizados como sendo glicolípideos. Os autores sugeriram que a formação do biossurfactante do tipo glicolípido, produzido por *R. erythropolis*, foi induzida por n-alcenos.

No trabalho de RAPP e col. (1979b) foi verificada uma produção de exopolissacarídeo (EPS) quando *R. erythropolis* foi crescida na presença de glicerol. Desta forma sugeriram que a fonte de carbono utilizada para produção de biossurfactante por *Rhodococcus* sp era determinante na predominância de um composto sobre o outro.

A partir desse momento da Tese, foram realizados estudos para melhorar a recuperação do biossurfactante produzido, considerando que apresentava uma porção polissacarídica, podendo ser um exopolissacarídeo (EPS).

5.2.1 Seleção de Solvente para Recuperação por Precipitação do Biossurfactante

O gráfico da Figura 5.11 mostra a concentração do biossurfactante recuperado por meio da precipitação com adição de diferentes solventes, relatados na literatura para recuperação de polissacarídeos. Pode-se constatar que apenas o etanol 95% com 5% metanol não promoveu boa precipitação comparada aos outros solventes. Os solventes mostraram-se similares quanto à recuperação do biossurfactante e optou-se pelo uso do etanol (-4°C) 95%, uma vez que é mais economicamente viável, podendo, inclusive, ser reutilizado.

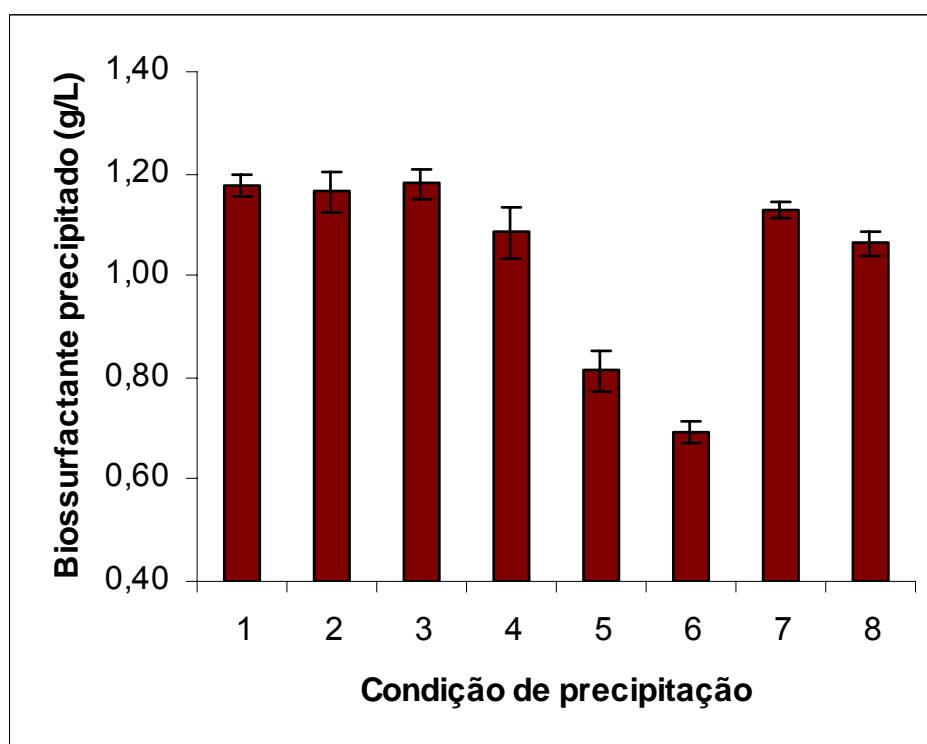


Figura 5.11 – Recuperação do biossurfactante do meio fermentado concentrado após precipitação com diferentes solventes em diferentes volumes solvente:amostra. (1 – acetona 4:1; 2 – acetona 3:1; 3 - etanol 95% 4:1; 4 – etanol 95% 3:1; 5 – etanol 95% com 5% metanol 4:1; 6 - etanol 95% com 5% metanol 3:1; 7 – isopropanol 4:1; 8 – isopropanol 3:1).

5.2.2 Estudo da Recuperação do Biossurfactante por Precipitação com Etanol 95%

O volume de etanol utilizado para recuperação do polissacarídeo não é fixo, variando de acordo com o polissacarídeo produzido por diferentes microrganismos. Muitos trabalhos que estudaram a produção de polissacarídeos por diversos microrganismos utilizaram etanol (-4°C) com diferentes volumes em relação ao meio fermentado, que variavam de 1:1 até 6:1 (CHI E col., 2007; MANCA e col., 1996; MENGISTU e col., 1994; GARCÍA-OCHOA e col., 2000; KORNMANN e col. 2003).

Na Figura 5.12 verifica-se o resultado da recuperação do biossurfactante em diferentes proporções de etanol 95% (-4°C) e meio fermentado não concentrado. Nota-se que foi preciso, no mínimo, uma proporção 4:1 de etanol 95% para precipitar e recuperar este biossurfactante em maior concentração ($0,30 \pm 0,02$ g/L).

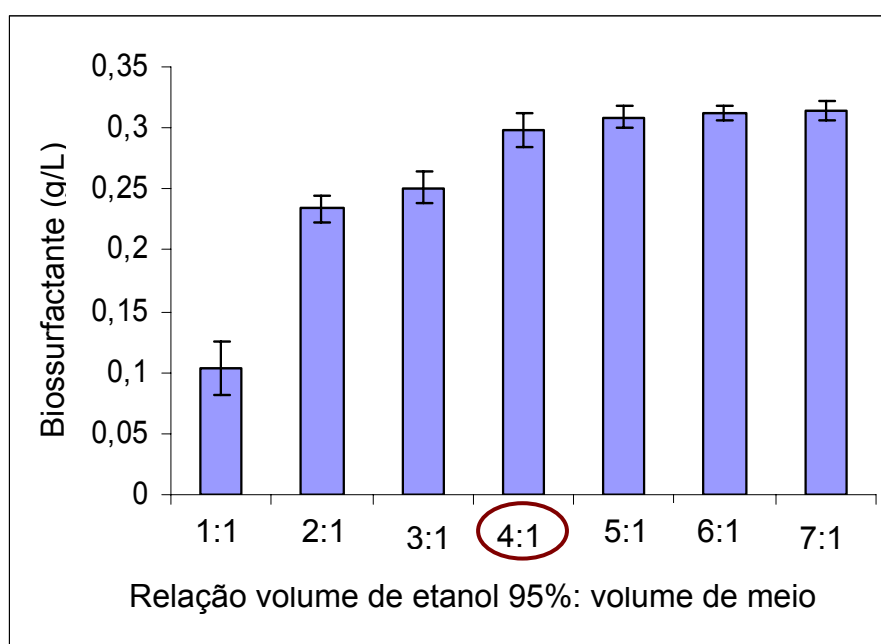


Figura 5.12 – Influência do volume de etanol (-4°C) 95% em relação ao meio fermentado, não concentrado, na recuperação do biossurfactante.

KORNMANN e col. (2003) sugerem uma metodologia de recuperação de polissacarídeo em várias etapas. Esta técnica foi utilizada para diminuir os resíduos do meio fermentado ou metabólitos produzidos na fermentação que pudessem precipitar com o polissacarídeo, mascarando as propriedades tensoativas do biossurfactante bruto e sua quantificação por método colorimétrico.

O resultado obtido não mostrou diferença significativa na concentração dos açúcares totais presentes no biossurfactante, que foi de $0,26 \pm 0,3$ g/L. Desta forma, optou-se por utilizar a metodologia de precipitação em uma única etapa para acompanhar a produção do biossurfactante produzido nos experimentos, reduzindo o tempo para obter o resultado e o solvente utilizado.

5.2.3 Extração do Polissacarídeo Aderido à Parede Celular

Os polissacarídeos fazem parte do envelope celular de muitas bactérias, com funções fisiológicas diversas para os microrganismos produtores, podendo ser liberado para o ambiente ou permanecer na parede celular.

Nos resultados obtidos até o momento, verificou-se que o biossurfactante estava presente no meio fermentado. No entanto, como existia a possibilidade do biossurfactante produzido ser um polissacarídeo, este poderia estar aderido à parede celular, necessitando de métodos de extração de polissacarídeos visando o aumento da concentração deste no meio fermentado. A Figura 5.13 mostra o efeito dos métodos de extração aplicados.

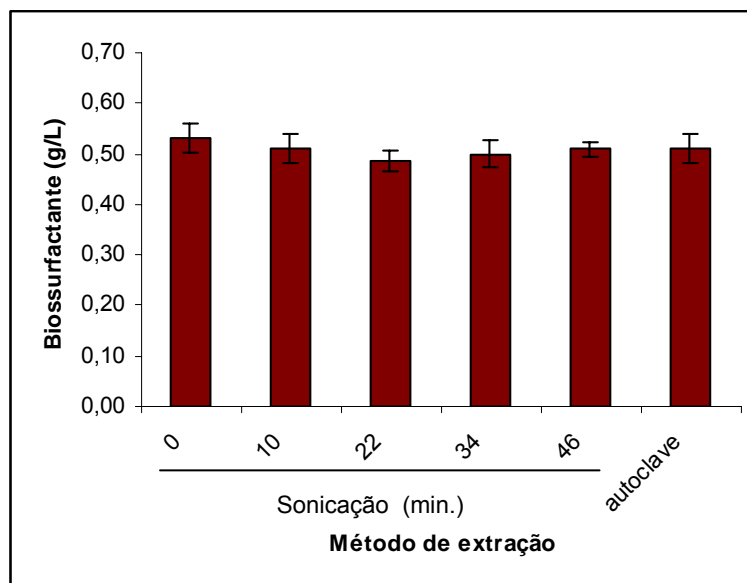


Figura 5.13 - Concentração do biossurfactante após métodos de extração de polissacarídeos da parede celular.

Nota-se que não houve diferença significativa nas concentrações de biossurfactante após os diferentes métodos de extração. No caso do uso de EDTA, não foi detectado resíduo de açúcares nos sobrenadantes analisados.

Desta forma, confirma-se o resultado de que o polissacarídeo produzido na presença de glicerol foi liberado para o meio de cultura e a recuperação do biossurfactante foi a máxima possível.

5.3 Caracterização Físico-Química do Biossurfactante Bruto

Na Tabela 5.6 são apresentadas as características físico-químicas do meio fermentado e do biossurfactante precipitado (ressuspendido em água destilada) obtidos a partir da fermentação realizada em batelada alimentada, na qual as condições de cultivo foram ajustadas para temperatura 37°C, com 2% de glicerol e nitrato de sódio na razão C/N 5.

Tabela 5.6 – Características físico-químicas do biossurfactante produzido por *Rhodococcus erythropolis* nas condições de cultivo empregadas.

Condição	Tensão Superficial (mN/m)	Tensão Interfacial* (mN/m)	Índice de Emulsificação (E ₂₄)%
Água	72,2 ± 0,8	39,6 ± 0,9	-
Meio de cultivo	66,3 ± 0,6	30,5 ± 0,6	-
Meio fermentado sem células	40,0 ± 1,2	10 ± 1,2	68,0 ± 1,5
Biossurfactante bruto (precipitado)	43,4 ± 2,1	13 ± 2,1	66,0 ± 1,5

* para hexadecano

Os valores de tensão superficial, interfacial e o E₂₄ obtidos no meio fermentado sem células indicam a presença de propriedades tensoativas no meio. Após recuperação do biossurfactante por etanol, seguido de ressuspensão em água destilada, as propriedades tensoativas se mantiveram, o que demonstra a contribuição do biossurfactante nas propriedades surfactantes do meio.

Os valores de TS e TI foram altos comparados a valores de biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo. Para MULLIGAN (2005), os melhores surfactantes reduzem a tensão superficial da água de 72 para valores menores ou iguais a 35 mN/m e a tensão interfacial do sistema água/hexadecano de 40 para 1 mN/m. Já para WILLUMSEN e KARLSON (1997), um bom surfactante é aquele capaz de reduzir a tensão superficial do meio com diferenças maiores ou iguais a 20 mN/m, que é o caso do biossurfactante obtido neste trabalho.

Pelos percentuais de emulsão (E₂₄), do tipo água/óleo, obtidos pode-se considerar este biossurfactante um ótimo emulsificante, podendo ser classificado como um bioemulsificante.

Na Figura 5.14 observa-se a emulsão promovida no sistema água/hexadecano por diferentes soluções de biossurfactante extraído. Nota-se

que o tipo de emulsão foi diferente dependendo da concentração do biossurfactante. Neste caso, a maior concentração propiciou uma emulsão mais estável. Assim, dependendo da aplicação do biossurfactante, deve-se levar em conta a concentração adequada para que sua atuação seja efetiva.



Figura 5.14 - Emulsificação do sistema *n*-hexadecano/solução de biossurfactante em diferentes concentrações. Da direita para a esquerda, soluções de 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 g/L de biossurfactante.

No que diz respeito à eficiência de emulsificação de biossurfactantes, ZHANG e col. (1999) estudaram a relação entre composição da molécula do surfactante e a atividade emulsificante. Os resultados obtidos indicaram que moléculas com cadeia curta de ácidos graxos ($\leq 14C$) promoviam a diminuição da atividade emulsificante. Em contraste, a atividade emulsificante aumentava proporcionalmente com o aumento do número de átomos das moléculas de ácidos graxos de cadeia longa ($\geq 15C$).

Na Figura 5.15 está representado o gráfico pelo qual foi determinada a Concentração Micelar Crítica do biossurfactante bruto. O valor obtido foi de 0,42 g/L, considerado um valor elevado quando comparado a outros biossurfactantes produzidos por *Rhodococcus* spp.

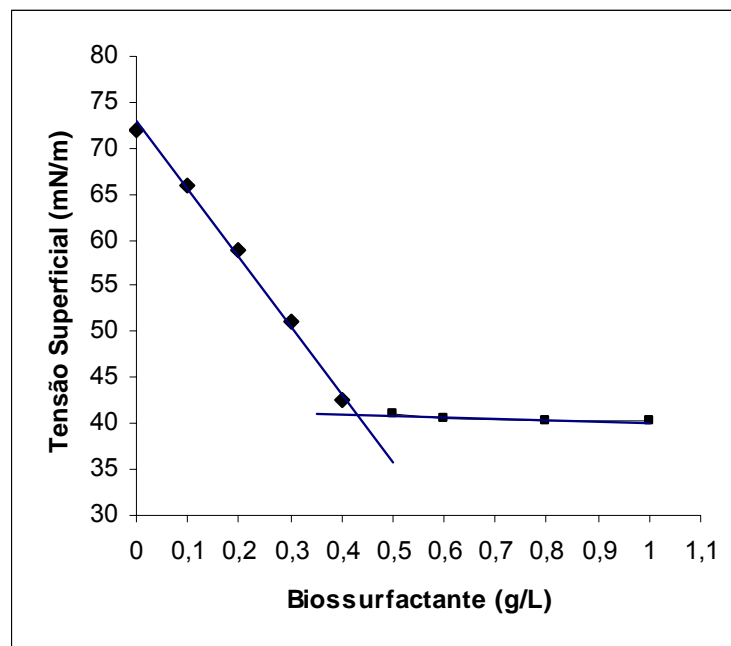


Figura 5.15 - Concentração Micelar Crítica obtida a partir do biossurfactante bruto diluído em água destilada.

KIM e col. (1990) obtiveram um surfactante, do tipo glicolípídeo, de *Rhodococcus erythropolis*, crescida em meio contendo uma mistura de hidrocarbonetos, que foi capaz de atingir uma tensão superficial de 26 mN/m, tensão interfacial menor que 1 mN/m e a Concentração Micelar Crítica de 15 mg/L.

Segundo BICCA e col. (1999), o biossurfactante produzido por *Rhodococcus ruber*, crescida em hexadecano, apresentou E_{24} de 63% e tensão superficial de 50 mN/m.

ESPUNY e col. (1996) relataram que o glicolípídeo produzido por *Rhodococcus erythropolis* em meio contendo n-alcanos, foi capaz de reduzir a tensão superficial para 30 mN/m. Já com o uso do glicerol como fonte de carbono, nas condições impostas, o surfactante produzido atingiu tensão superficial de 48 mN/m.

WHYTE e col. (1999) verificaram que a bactéria *Rhodococcus* Q15 produziu um surfactante capaz de reduzir a tensão superficial para 36 mN/m, quando crescida em hexadecano.

No trabalho de PHILP e col. (2002), o glicolípido produzido por *Rhodococcus ruber* reduziu a tensão superficial e interfacial para 27 e 1,8 mN/m, respectivamente.

MUTALIK e col. (2008), obtiveram um biossurfactante de *Rhodococcus* sp que possibilitou a redução da tensão superficial da água para 30,8 mN/m, uma CMC de 120 mg/L e E_{24} de 78,4%.

Segundo TULEVA e col. (2008), o glicolípido produzido por *Rhodococcus wratislaviensis* foi capaz de reduzir a tensão superficial e interfacial para 24,4 e 1,3 mN/m, CMC de 5 mg/L e Emulsão de 65%.

Segundo PIROG e col. (2004), estudando a produção de biossurfactante por *Rhodococcus* sp em diferentes fontes de carbono, verificaram que o surfactante produzido em substrato hidrofóbico apresentou menor tensão superficial (30 – 39 mN/m) e atividade emulsificante (Índice de Emulsificação) de 23 – 56%, ao contrário do surfactante produzido em substrato hidrofílico no qual a tensão superficial foi de 50 – 55 mN/m, mas com atividade emulsificante de 60 – 88%. A presença do substrato solúvel favoreceu a produção de emulsificantes.

Considerando a hipótese que o biossurfactante produzido, nas condições impostas neste trabalho, apresenta uma porção polissacarídica, os resultados corroboram com ROSENBERG e RON (1999), os quais salientam que biossurfactantes com alta massa molecular do tipo polissacarídeos são eficientes emulsificantes (bioemulsificantes) sem promover, no entanto, reduções acentuadas nos valores de tensão superficial. Esta propriedade é especialmente importante para uso em cosméticos e alimentos. Segundo esses mesmos autores, várias espécies de bactérias produzem surfactantes poliméricos extracelulares constituídos de polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou um complexo desses biopolímeros. Pode-se destacar o bioemulsificante ALASAN, produzido por *Acinetobacter radioresistens*, que é um complexo de polissacarídeos e proteínas, capaz de reduzir a tensão superficial de 69 para 41 mN/m e sua CMC é de 200 mg/L. Assim como outros bioemulsificantes, ALASAN é eficiente na estabilização de

emulsões água/óleo, no entanto, não é tão eficiente na redução da tensão superficial. O EMULSAN, produzido pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* RAG1, é um complexo de heteropolissacarídeo aniônico e proteína que apresenta elevado poder emulsificante, mesmo em baixas concentrações, na faixa de 0,01 a 0,1 g/L .

5.3.1 Influência do pH na Tensão Superficial

Para avaliar o efeito do pH sobre a tensão superficial da solução de 0,6 g/L do biossurfactante bruto, foram obtidos os valores de Tensão Superficial em pH variando entre 1 e 13, conforme mostrado na Figura 5.16.

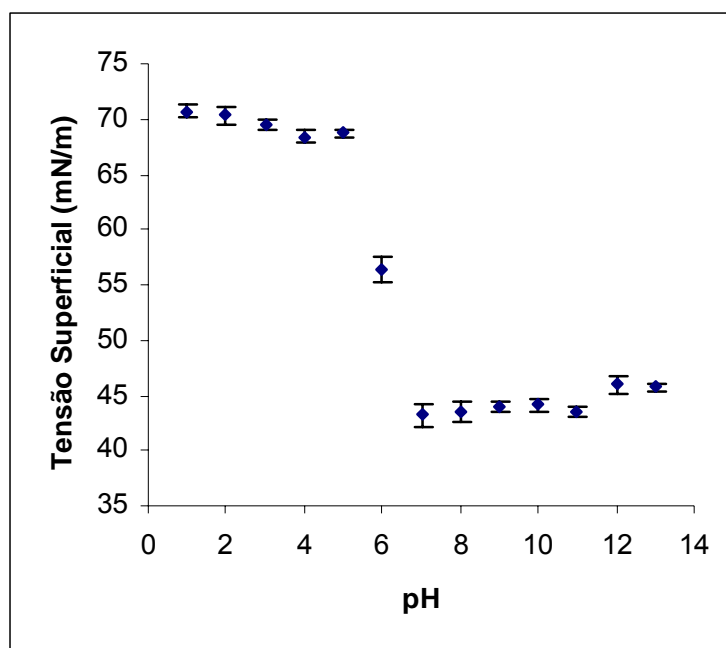


Figura 5.16 - Variação da Tensão Superficial da solução 0,6 g/L de biossurfactante bruto em função do pH.

Nota-se que a tensão superficial diminuiu em pH próximo a neutralidade atingindo 43,2 mN/m em pH 7, mantendo-se em valores próximos a 44-45 mN/m em valores de pH básicos. A alta tensão superficial obtida em pH ácido é

explicada pela precipitação ocorrida, não havendo, portanto, alteração da tensão superficial da água.

Assim, a aplicação deste biossurfactante fica limitada a condições de pH neutro a alcalino.

5.4 Relação entre a Quantificação do Biossurfactante pelo Método Colorimétrico Fenol-Sulfúrico e por Massa Seca.

A quantificação do biossurfactante foi realizada pelo método colorimétrico fenol-sulfúrico, muito utilizado para quantificação de açúcares totais, inclusive polissacarídeos. Este método não leva em conta a presença de proteínas ou lipídeos na molécula, muitas vezes presente nos biossurfactantes. Desta forma, quando se optou em relatar a concentração de açúcar obtida pelo método fenol-sulfúrico como concentração de biossurfactante, sabia-se que os resultados de concentração de biossurfactante ficariam subestimados.

Assim, de modo a quantificar o biossurfactante, considerando todos os seus constituintes, optou-se por secar e pesar o bioproduto, relatando a concentração do biossurfactante em massa seca. Estabeleceu-se uma relação das concentrações de biossurfactante obtida pelos dois métodos de quantificação. A Figura 5.17 apresenta o gráfico desta relação. Nota-se pelo coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9964$), que os resultados apresentaram excelente ajuste, obtendo-se, assim, uma equação ($y=0,0524x - 0,0019$) que relacionou os valores de concentração quantificados pelas duas metodologias.

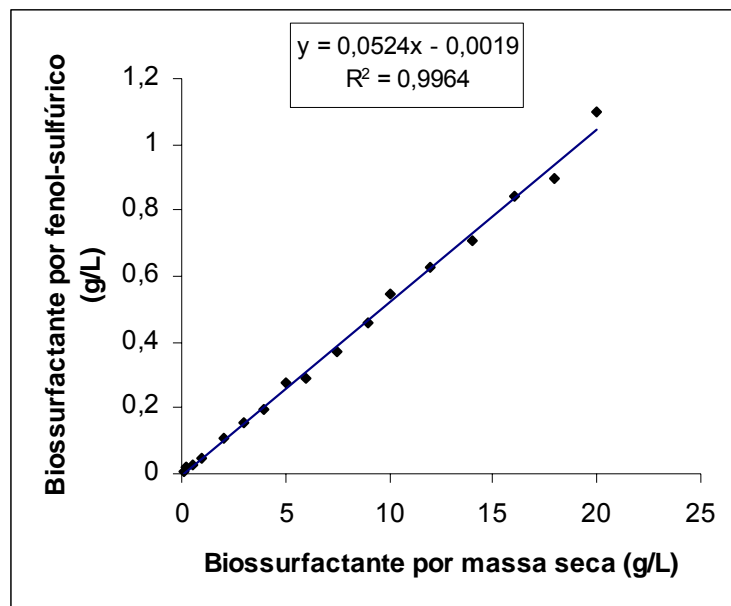


Figura 5.17 - Relação da quantificação do biossurfactante pelo método fenol-sulfúrico e por massa seca.

Desta forma, os valores de produção de biossurfactante obtidos neste trabalho podem ser corrigidos. Considerando-se a produção do biossurfactante de $0,97 \pm 0,05$ g/L, obtida no experimento em biorreator conduzido em batelada alimentada, quantificado pelo método fenol-sulfúrico, tem-se uma produção de $18,51 \pm 0,95$ g/L do biossurfactante por massa seca. Esta produção, agora, aproxima-se das maiores produções de biossurfactante obtidas relatadas nos trabalhos de KIM e col. (1990), PHILP e col. (2002) e MUTALIK e col. (2008), que foram de 32 g/L, 9,0 g/L e 10,9 g/L, respectivamente, quantificadas também em massa seca.

Sabe-se, todavia, que a quantificação por massa seca pode superestimar os resultados. Tal problema foi minimizado nesta quantificação, pois o biossurfactante bruto, para este experimento, foi obtido pela técnica de precipitação em várias etapas com posterior diálise, diminuindo os resíduos (sais inorgânicos) que poderiam estar presentes no precipitado superestimando a massa seca do biossurfactante.

5.5 Caracterização Parcial da Estrutura do Biossurfactante

Na Figura 5.18 está o cromatograma, obtido por meio de HPLC, do biossurfactante hidrolisado. É possível visualizar três picos de açúcares (setas), com tempos de retenção de 11,95 min, 13,70 min e 15,61 min, que coincidem com o tempo de retenção dos padrões de glicose, galactose e manose, respectivamente.

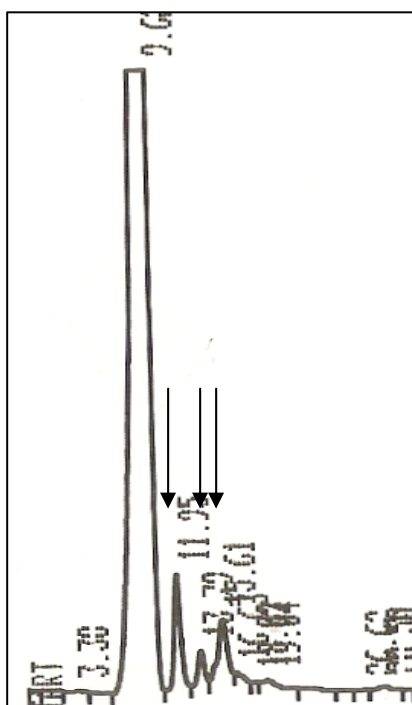


Figura 5.18 – Cromatograma de HPLC do biossurfactante bruto hidrolisado, mostrando três picos (setas) que coincidem com glicose, galactose e manose, respectivamente.

O primeiro pico, com um tempo de retenção de 9,64 min, refere-se ao TFA utilizado para a hidrólise, que se manteve na amostra. Este pode estar mascarando a visualização de outro açúcar que tenha o mesmo tempo de retenção (coeluição), como no caso da rafinose. Apesar deste resultado, o cromatograma não é conclusivo para caracterização total dos açúcares constituintes do biossurfactante.

A amostra hidrolisada passou por novos processos de evaporação a 40°C em rotavapor para eliminação dos resíduos do TFA, no entanto, não foi obtido sucesso. O ácido se manteve na solução de análise e houve redução no sinal dos açúcares encontrados anteriormente. A metodologia de detecção de açúcares por HPLC é limitada quando os açúcares estão em baixas concentrações, como 1 g/L ou abaixo deste valor, o que dificulta a caracterização total dos açúcares constituintes do polissacarídeo que possam estar presentes em menor concentração.

Métodos analíticos que apresentem maior seletividade dos analitos e permitam eliminar problemas de coeluição podem permitir uma caracterização mais aprimorada do biossurfactante. Entre as possíveis metodologias analíticas a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS/MS) apresenta-se como uma das mais apropriadas para a caracterização, sendo necessárias colunas e padrões específicos e o desenvolvimento de uma metodologia exclusiva para o biossurfactante e longos tempos de padronização da técnica.

Apesar disto, o resultado do cromatograma obtido por HPLC indicou que o biossurfactante apresenta uma porção polissacarídica.

Pode-se levantar uma hipótese sobre a presença de lipídeos na estrutura do biossurfactante. O biossurfactante apresentou capacidade emulsificante que foi confirmada pelo Índice de Emulsificação obtido (66%). Esta emulsão pode ser decorrente da presença de proteína e/ou lipídeo no composto. Pelo método de Lowry, ficou constatada a ausência de proteína na estrutura do biossurfactante bruto. Assim, pode-se supor que haja uma porção lipídica associada ao polissacarídeo.

Recentemente, alguns trabalhos determinaram a estrutura química de EPS produzido por diferentes espécies de *Rhodococcus*, independentemente de sua função para a bactéria.

IWABUCHI e col. (2002) constataram a produção de EPS, contendo glicose, galactose, manose, ácido glicurônico e lipídeos na sua estrutura, que apresentou atividade emulsificante. URAI e col. (2002) verificaram a produção

de EPS por *Rhodococcus* sp, contendo D-galactose, D-glicose, D-fucose, D-ácido glicurônico, além de ácido esteárico, ácido palmítico e ácido pirúvico, com atividade emulsificante. No entanto, estes trabalhos não determinaram o percentual de emulsão obtido ou outras propriedades tensoativas que caracterizariam o polissacarídeo como um biossurfactante.

Em 2006, URAI e col. verificaram que *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 53968 produziu um EPS, com alta viscosidade e, por meio de análises de HPLC, CG/MS e RMN concluíram que esse bioproduto era composto por galactose, glicose, fucose, ácido glicurônico, ácido esteárico, ácido palmítico e ácido pirúvico.

URAI e col. (2007) elucidaram a composição química de um polissacarídeo extracelular, produzido por *Rhodococcus erythropolis* PR4, por meio de análises de HPLC, CG/MS e RMN, no qual continha glicose, N-acetilglicosamina, ácido glicurônico e fucose.

PERRY e col. (2007) elucidaram a estrutura do EPS produzido por *Rhodococcus* sp RHA1, considerada uma das bactérias mais eficientes na degradação de bifenilas policloradas. O EPS era um polímero de alta massa molecular composto por ácido glicurônico, glicose, galactose, fucose e O-acetil. Os autores consideraram que a elucidação da estrutura do EPS era uma etapa importante para entender sua função no crescimento bacteriano, sobrevivência, manutenção da atividade metabólica e atuação como biossurfactante.

5.6 Estudo do Efeito do Biossurfactante na Biodegradação de Borra Oleosa da Indústria do Petróleo

Pelo experimento realizado por respirometria foi possível obter informações sobre a atividade metabólica dos microrganismos autóctones durante a biodegradação do poluente.

A Figura 5.19 mostra o registro do consumo de oxigênio acumulado ao longo de 168 horas de experimento. Nota-se aumento do consumo de oxigênio em todos os experimentos, o que sugere que os microrganismos autóctones

foram ativados nas condições de temperatura e aeração impostas neste experimento, e pela presença de N, P e K no meio de cultura adicionado.

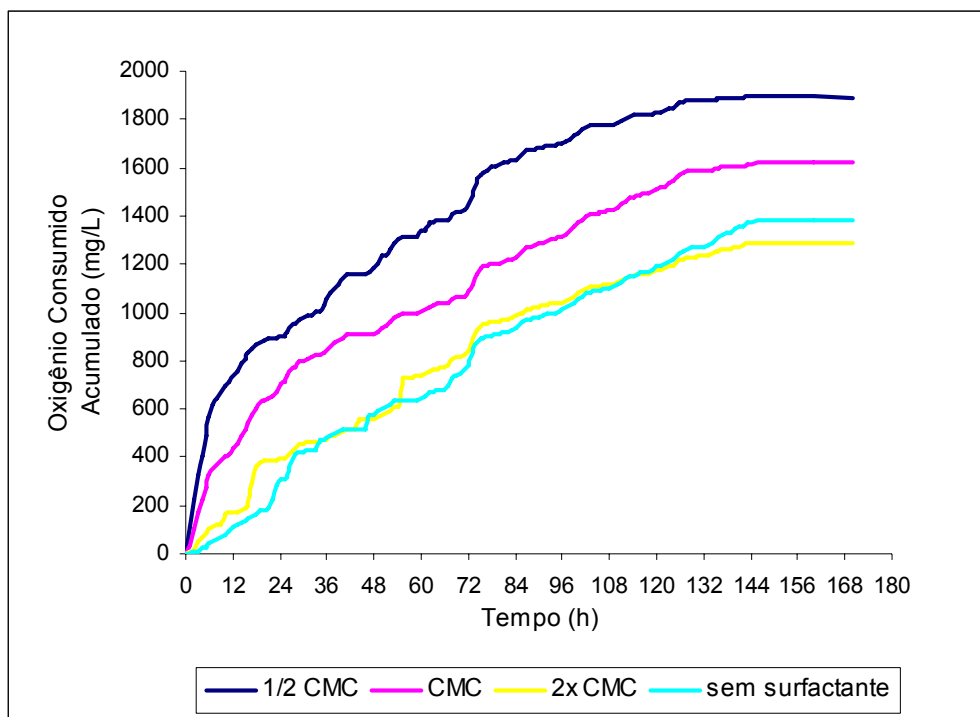


Figura 5.19 – Curvas de consumo de oxigênio acumulado na biodegradação da borra oleosa frente a diferentes concentrações de biossurfactante.

Isto pode ser confirmado pelos resultados de quantificação dos microrganismos autóctones da borra oleosa no final dos ensaios, com e sem surfactante, que mostrou um acentuado aumento da microbiota ao término do experimento (Tabela 5.7).

O aumento da atividade metabólica poderia ser em decorrência do consumo do biossurfactante como fonte de carbono preferencial e não pelo consumo do óleo. Se isto tivesse acontecido, era esperado que nos três ensaios contendo surfactante, o consumo de oxigênio seria maior que o consumo do ensaio controle. No entanto, nota-se que, ao longo de todo experimento, 168 horas, a atividade metabólica do ensaio contendo tensoativo acima da CMC foi similar a registrada no controle. Desta forma, pode-se dizer que a atividade metabólica dos microrganismos foi provocada pelo consumo do óleo. Evidentemente, seria necessário confirmar esta declaração por meio da

análise do consumo do óleo. Entretanto, esses resultados não foram obtidos neste experimento.

Tabela 5.7 – Contagem da microbiota autóctone da borra oleosa em 168 horas.

Ensaio com diferentes concentrações de biossurfactante bruto	Microrganismos autóctones (UFC/ g de borra oleosa)
Controle	6,5 x 10 ⁵
1/2 CMC (0,21 g/L)	2,1 x 10 ⁸
CMC (0,42 g/L)	1,7 x 10 ⁸
2 x CMC (0,84 g/L)	8,9 x 10 ⁵

População inicial = 5,2 x 10⁴ UFC/g

A adição de biossurfactante abaixo da CMC (0,21 g/L) e na CMC (0,42 g/L) teve um efeito estimulador da atividade metabólica dos microrganismos, conforme registrado em 24 horas de experimento, quando o consumo de oxigênio acumulado nestes ensaios foi, praticamente, o dobro do registrado no controle. Isto pode ser devido ao aumento da disponibilidade do óleo promovido pelo biossurfactante, o que levou ao acentuado crescimento dos microrganismos nestes ensaios (Tabela 5.7). Entretanto, a adição do tensoativo acima da CMC (0,84 g/L) não promoveu aumento do consumo de oxigênio comparado ao controle, e houve um decréscimo deste a partir de 130 h de experimento. Nota-se na Tabela 5.7 que o crescimento bacteriano foi menor neste ensaio comparado aos outros com surfactante. Isto pode ser explicado pela formação de microemulsões, muito estáveis, promovidas pelo aumento da concentração do biossurfactante. Segundo WILLUMSEN & KARLSON (1997), a estabilidade da emulsão do óleo poderia prejudicar a biodegradação do poluente por dificultar a penetração da bactéria na camada emulsificada devido ação na parede celular.

Na Figura 5.14, é possível visualizar, com clareza, a variação da emulsão do sistema água/hexadecano provocada pelas diferentes concentrações do biossurfactante bruto.

Desta forma, o sucesso da aplicação do surfactante na biorremediação vai depender do tipo e concentração dos biossurfactantes utilizados.

IWABUCHI e col. (2002) estudaram o efeito de um exopolissacarídeo produzido por *Rhodococcus rhodochrous* S-2 (S-2 EPS) no crescimento de bactérias autóctones do ambiente marinho na presença de hidrocarbonetos poliaromáticos. Verificaram que as bactérias autóctones não cresceram significativamente em água do mar suplementada com nitrogênio, fósforo e ferro. A adição de 100 mg/L S-2 EPS resultou na emulsificação dos hidrocarbonetos, promovendo o crescimento da microbiota e aumento da degradação. Os autores compararam a atuação deste biossurfactante com 15 surfactantes sintéticos e concluíram que o S-2 EPS foi o mais eficiente na aceleração da biodegradação.

BARKAY e col. (1999), utilizando ALASAN, um bioemulsificante formado por um complexo de polissacarídeo aniônico e proteínas, produzido por *Acinetobacter radioresistens* KA53, verificaram aumento da solubilidade e biodegradação de hidrocarbonetos poliaromáticos. Na presença de 500 mg de ALASAN/L, a aparente solubilidade de fenantreno, fluoranteno e pireno aumentou em 6,6; 25,7 e 19,8 vezes, respectivamente.

WHANG e col. (2007) estudaram a aplicação de raminolipídeos e surfactina na biodegradação de solo contaminado com diesel. Ambos foram capazes de aumentar a solubilidade do poluente com o aumento da concentração do biossurfactante, acima da CMC de 45 e 50 mg/L para surfactina e raminolipídeos, respectivamente. A adição de 0 a 80 mg/L de raminolipídeo aumentou a porcentagem de biodegradação de 40 para 100%. O aumento da concentração do raminolipídeo para 160 mg/L teve resultado similar ao obtido com 80 mg/L. Já a adição de 40 mg/L de surfactina resultou em 94% na biodegradação. Adição de surfactina acima de 40 mg/L, entretanto, diminuiu a eficiência da biodegradação, sendo que com 400 mg/L de

biossurfactante não houve a biodegradação. Os autores ressaltaram que os tensoativos utilizados estimularam a biodegradação do diesel, no entanto, a escolha do biossurfactante deve ser feita com cautela para evitar efeitos inibitórios na biodegradação, uma vez que alguns surfactantes apresentam atividade antibiótica que inibem a atividade dos microrganismos degradadores.

O efeito inibitório do biossurfactante foi verificado no trabalho de NOORDEMAN e JANSSEN (2002), no qual a biodegradação de hexadecano por *P. aeruginosa* foi estimulada com a adição de raminolípídeo sintetizado pelo próprio microrganismo, mas não houve degradação na presença de biossurfactantes produzidos por outros microrganismos.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

- ✓ *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 foi capaz de produzir biossurfactante na presença de *n*-hexadecano e glicerol, a 28°C, em experimentos realizados em frascos agitados. A atividade emulsificante do biossurfactante foi constatada pelo Índice de Emulsificação (E_{24}) de 58% e 60% nos meios fermentados com *n*-hexadecano e glicerol, respectivamente;
- ✓ A produção de biossurfactante foi similar em *n*-hexadecano e em glicerol. Entretanto, o biossurfactante permaneceu aderido à parede celular quando produzido em hexadecano, ao contrário do produzido em glicerol que foi liberado para o meio fermentado. O glicerol mostrou ser uma fonte de carbono adequada para produção de biossurfactante por *Rhododoccus erythropolis*, pois foi capaz de promover a produção do biossurfactante e também sua liberação para o meio fermentado;

- ✓ A temperatura de 37°C aumentou a produtividade do processo de produção de biossurfactante quando comparado ao valor obtido nos experimentos a 28°C, de 33 mg/L.h para 75 mg/L.h. O aumento da temperatura também influenciou no perfil cinético de produção do biossurfactante, passando de uma produção semi-associada ao crescimento a 28°C para uma produção associada ao crescimento a 37°C;
- ✓ O nitrato de sódio proporcionou um aumento de 39% na concentração do biossurfactante em relação à condição inicial do meio de cultivo, quando utilizado sulfato de amônio e nitrato de sódio como fontes de nitrogênio, aumentando de $0,17 \pm 0,03$ g/L para $0,25 \pm 0,03$ g/L; atingindo uma produtividade volumétrica de 12 mg/L.h e um aumento relevante do fator de rendimento em produto por biomassa ($Y_{P/X}$) (de 0,08 para 0,33 g/g);
- ✓ A adição de nitrato de sódio na razão C/N 5 incrementou a produção do biossurfactante que, praticamente, dobrou sua concentração quando comparado ao meio de cultivo inicial, no qual utilizou sulfato de amônio e nitrato de sódio na razão C/N 14, aumentando de 0,17 g/L para 0,31 g/L;
- ✓ O aumento da concentração do inóculo para $1,71 \pm 0,06$ g/L aumentou a produtividade de 12 mg/L.h para 22 mg/L.h e a condução do bioprocessamento por batelada alimentada por pulsos de glicerol foi essencial para melhorar a produção do biossurfactante estudado e sua produtividade, uma vez que, no final do processo, o biossurfactante atingiu uma concentração de $0,97 \pm 0,05$ g/L do tensoativo e uma produtividade de 30 mg/L.h. Isto equivale dizer que houve um incremento de 6 vezes na produção do biossurfactante e aumento de 2,5 vezes na produtividade, no final deste trabalho;
- ✓ O biossurfactante produzido em glicerol é um biossurfactante predominantemente extracelular, uma vez que não houve indícios de polissacarídeos aderidos a célula, pois não foi constatado aumento da

concentração destes após aplicação de diferentes técnicas de extração de polissacarídeos aderidos a parede celular;

- ✓ O biossurfactante produzido em glicerol e nitrato de sódio, C/N 5, a 37°C, recuperado do meio de cultura e ressuspensionado em água, apresentou atividade tensoativa constatada por suas características físico-químicas de tensão superficial de $43,4 \pm 2,1$ mN/m, tensão interfacial frente ao hexadecano de $13 \pm 2,1$ mN/m, atividade emulsificante de 66%; CMC de 0,42 g/L, similares aos valores do meio de cultivo livre de células;
- ✓ O biossurfactante bruto tem aplicação restrita na faixa de pH igual ou maior a 7, pois não teve atividade tensoativa em pH ácido, na faixa de 1 a 6, uma vez que esses valores provocaram sua precipitação em solução;
- ✓ Foi possível estabelecer uma correlação linear entre a concentração do biossurfactante obtido pelo método colorimétrico e por massa seca, o qual elevaria a produção do biossurfactante para $18,51 \pm 0,95$ g/L;
- ✓ A caracterização parcial do biossurfactante revelou a presença de polissacarídeo constituído por, pelo menos, glicose, manose e galactose;
- ✓ O biossurfactante bruto apresentou potencial para aplicação na biodegradação de uma borra oleosa da indústria do petróleo, pois estimulou a atividade dos microrganismos. Entretanto, a concentração do biossurfactante foi determinante para sua atuação na aceleração da atividade metabólica da microbiota, uma vez que a concentração menor ou igual a CMC teve efeito positivo no processo de biodegradação e a concentração acima da CMC não apresentou efeito neste processo.

CAPÍTULO 7

RECOMENDAÇÕES

Para dar continuidade aos estudos da produção de biossurfactante por *Rhodococcus erythropolis*, sugere-se:

- Caracterização total da estrutura química do biossurfactante, elucidando sua composição;
- Avaliação de diferentes % de saturação de oxigênio no meio e agitação na produção do biossurfactante;
- Estudo da produção do biossurfactante em n-hexadecano, considerando-se a formação de glicolipídeos e polissacarídeos, com posterior caracterização físico-química e estrutural dos compostos, comparando-se com o produzido em glicerol;

- Otimização da biodegradação de compostos hidrofóbicos, na presença do biossurfactante, monitorando a redução do poluente;
- Aplicação do biossurfactante, como agente emulsificante, aplicados na recuperação de áreas degradadas pela presença de hidrocarbonetos e tratamento de efluentes, na remoção de agentes oleosos;
- Uso de glicerina bruta, oriunda da obtenção do biodiesel, na produção do biossurfactante.

CAPÍTULO 8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALKASRAWI, M.; ERIKSSON, T.; BÖRJESSON, J.; WINGREN, A.; GALBE, M; TJERNELD,F.; ZACCHI, G. The effect of tween-20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood to ethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, 33: 71-78, 2003.

ASTM D 971. 99^a Standard test method for interfacial tension of oil against water by the ring. In: **Method American Society for Testing Materials**. 1999

BABU, P. S., VAIDYA, A. N., BAL, A. S., KAPUR, R., JUWARKAR, A., KHANNA,P. Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. **Biotechnology Letters**, 18: 263 - 68, 1996.

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

BARKAY, T.; NAVON-VENEZIA, S.; RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier Alasan. **Applied and Environmental Microbiology**, 65: 2697-2702, 1999.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; MARÓSTICA, M.R.; PASTORE, M.G. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, 30: 1-14, 2007.

BARTHA, R. Biotechnology Of Petroleum Pollutant Biodegradation. **Microbiological Ecology**, 12: 155-72, 1986.

BEAL, R. e BETTS, W. B. Role of rhamnolipid biosurfactans in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, 89: 158-168, 2000.

BELL, K.S.; PHILP, J.C.; AW, K.J.W.; CHRISTOFI, N. The Genus *Rhodococcus*. **Journal of Applied Microbiology**, 85:195-210, 1998

BENEY, L. e GERVAIS, P. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. **Applied Environmental Microbiology**, 57: 34-42, 2001.

BENINCASA, M. Rhamnolipid produced from agroindustrial wastes enhances hydrocarbon biodegradation in contaminated soil. **Current Microbiology**, 54: 447-449, 2007.

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 Food Engineering**. 54: 283-88,2002.

BICCA, F.C. FLECK, L.C.; AYUB, M.A.Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**, 30: 231- 236, 1999.

BOGNOLO G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids Surfactants**, 152: 41-52, 1999

BONILLA, M.; OLIVARO, C.; CORONA, M.; VASQUEZ, A.; SOUBES, M. Production and characterization of a new bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2. **Journal of Applied Microbiology**, 98: 456-463, 2005.

BRADY, J.E. e HUMISTON, G.E. Química Geral. **Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos**, 1981.

BURKOVSKI, A. Ammonium assimilation and nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum* and its relatives: na example for new regulatory mechanisms in actinomycetes. **FEMS Microbiology Reviews**, 27: 617-628, 2003.

CAMEOTRA S.S e MAKAR, R.S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion Microbiology**, 7: 1-5, 2004.

CAMMAROTA, M. e SANT'ANNA JR, G.L. Metabolic blocking of exopolysaccharides synthesis: effects on microbial adhesion and biofilm accumulation. **Biotechnology Letters**, 20: 1-4, 1998.

CARVALHO, C.C.C.R. e FONSECA, M.M.R. The remarkable *Rhododoccus erythropolis*. **Applied Microbiology Biotchnology**, 67: 715-726, 2005.

CHI,Z.; SU, C.D.; LU, W.D. A new exopolysaccharide produced by marine *Cyanothece* sp 113. **Bioresource Technology**, 98: 1329-1332, 2007.

CHRISTOFI, N. e IVSHINA, I.B. A review - Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal Applied Microbiology**, 93: 915-29, 2002.

CIAPINA, E.M.P. Isolamento e seleção de bactérias produtoras de biosurfactante. São Paulo, 2001. (**Dissertação de mestrado** – Biotecnologia/ Universidade de São Paulo).

CIAPINA, E.M.P.; MELO, W.C.; SANTA ANNA, L.M.M.; SANTOS, A.S.; FREIRE, D.M.G.; PEREIRA JR, N. Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* grown on glycerol as sole carbon source. **Applied Biochemistry Biotechnology**, 131: 880-886, 2006.

COOPER, D.G. e GOLDENBERG, B.G. Surface active agents from two *bacillus* species. **Appied Environmental Microbiology**, 53: 224-29, 1987

COOPER, D.G. e ZAJIC, J.E. Surface active compounds from microorganisms. **Advanced Applied Microbiology**, 26: 229-53, 1980.

DATYNER, A. Surfactants in textile processing. **Surfactants science series**, v. 14,1983.

DAVIS, D.A., LYNCH, H.C.; VARLEY, J. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. **Enzyme Microbial Technology**, 25: 322-29, 1999.

DESAI, J. D. e BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology Molecular Biology Review**, 61: 47-67, 1997.

DÉZIEL, E., PAQUETE, G., VILLEMUR, R., LÉPINE, F. & BISAILLON, J. Biosurfactants Production By A Soil *Pseudomonas* Strain Growing On Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Applied Environmental Microbiology**, 62, 1908-1912, 1996.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P. A; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**. 28: 350-356, 1956.

ERIKSSON, T.; BÖRJESSON, J.; TJERNELD, F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, 31: 353-364, 2002.

ESPUNY, M.J.; EGIDO, S.; RODÓN, I.; MANRESA, A.; MERCADÉ, M.E. Nutritional requirements of a biosurfactant producing strain *Rhodococcus* Sp 51T7. **Biotechnology Letters**, 18: 521-26, 1996.

FALATKO, D. M., NOVAK, J. T. Effects Of Biologically Produced Surfactants On The Mobility And Biodegradation Of Petroleum Hydrocarbons. **Water Environmental Reserch.**, 64: 163- 69, 1992.

FIECHTER, A. Biosurfactants: Moving Towards Industrial Application. **Trends Biotechnology**, 10 : 208 - 17, 1992.

FINNERTY, W.R. The biology and genetics of genus *Rhodococcus*. **Annual Reviews Microbiology.**, 46: 193-218, 1992

FOX, S. L. e BALA, G.A . Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresearch Technology**, 75: 235-40, 2000.

FREIRE, D.M.G.; ARAUJO, L.V.; KRONEMBERGER, F.A.; NITSCHKE, M. Biosurfactants as emerging additives in food processing. IN **Innovation in Food Engineering: New Techniques**. Taylor & Francis USA. (no prelo).

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, 18: 549-579, 2000.

GEORGIU, G. ; LIN, S. C.; SHARMA, M. M. Surface –active compounds from microorganisms. **Bio/technology**, 10: 60-5, 1992.

GHURYE, G.L.; VIPULANANDAN, C., WILLSON, R.C. A Practical approach to biosurfactant production using nonaseptic fermentation of mixed cultures. **Biotechnology Bioengineering**, 44: 661-66, 1994.

GOYAL, N.; JAIN, S.C., BANERJEE, U.C. Comparative studies on the microbial adsorption of heavy metals. **Advanced Environmental Research**, 7: 311-319, 2003.

GUERRA-SANTOS, L., KAPPELI, O., FIECHTER, A. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. **Applied Microbiology Biotechnology**, 24: 443-48, 1986.

HARVEY, S.; ELASHVILI, I.; VALDES, J.J.; KAMELY, D.; CHAKRABARTY, A.M. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. **Biotechnology**. 8: 228-230, 1990.

HONG, K.J. e col. Evaluation of remediation process with plant-derived biosurfactant for recovery of heavy metals from contaminated soils. **Chemosphere**, 49: 379-87, 2002.

HUNG, C.C.; SANTSCI, P.H.; GILLOW, J.F. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides produced by *Pseudomonas fluorescens* Biovar II. **Carbohydrate Polymers**, 3: 1-7, 2005.

HWANG, H.J.; KIM, S.W.; CHOI, J.W.; YUN, J.W. Production and characterization of exopolysaccharide from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190. **Enzyme and Microbial Technology**, 33:309-319, 2003.

IVSHINA, I.B.; KUYUKINA, M.S.; PHILP, J.C.; CHRISTOFI, N. Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species. **World Journal Microbiology Biotechnology**, 14: 711-717, 1998

IWABUCHI, N.; SUNAIRI, M.; ANZAI, H.; NAKAJIMA, M.; HARAYAMA, S. Relationships between colony morphotypes and oil tolerance in *Rhodococcus rhodochrous*. **Applied and Environmental Microbiology**, 66: 5073-5077, 2000.

IWABUCHI, N.; SUNAIRI, M.; URAI, M.; ITOH, C.; ANZAI, H.; NAKAJIMA, M.; HARAYAMA, S. Extracellular polysaccharides of *Rhodococcus rhodochrous* S-2 stimulate the degradation of aromatic components in crude oil by indigenous marine bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 68: 2337-2343, 2002.

IWABUCHI, N.; SUNAIRI, M.; ANZAI, H.; MORISAKI, H.; NAKAJIMA, M. Relationships among colony morphotypes, cell-surface properties and bacterial adhesion to substrata in *Rhodococcus*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 30: 51-60, 2003.

JAIN, D. K., LEE, H., TREVORS, J.T. Effect Of Addition Of *Pseudomonas Aeruginosa* UG2 Inocula Or Biosurfactants On Biodegradation Of Selected Hydrocarbons In Soil. **Journal Industrial Microbiology**, 10: 87-93, 1992.

KANGA, S.H.; BONNER, J.S.; PAGE, C.A.; MILLS, M.A.; AUTENRIETH, R.L. Solubilization of naphthalene and methyl-substituted naphthalene from crude oil using biosurfactants. **Environment Science Technology**, 31: 556-561, 1997.

KIM, H.S e col. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal Fermentation Bioengineering**, 84: 41-46, 1997.

KIM, J.S; POWALLA, M.; LANG, S.; WAGNER, F.; LUNSDORF, H.; WRAY, V. Microbial glycolipid production under nitrogen limitation and resting cell conditions. **Journal Biotechnology**, 13: 257-266, 1990.

KOCH, A K., KÄPPELI, O, FIECHTER, A & REISER, J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant producing in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Journal Bacteriology**, 173: 4212-19, 1991.

KORNMANN, H.; DUBOC, P.; MARISON, I.; STOCKAR, U. Influence of nutritional factors on the nature, yield, and composition of exopolysaccharides produced by *Gluconacetabacter xylinus* I-2281. **Applied and Environmental Microbiology**, 69: 6091-6098, 2003.

KOSARIC, N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. **Food Technology and Biotechnology**, 39: 295-304, 2001.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure Applied Chemistry**, 64: 1731-1737, 1992.

KRONEMBERGER, F.A.; ANNA, L. M. M. S. ; FERNANDES, A. C. L. B. ; MENEZES, R. R. ; BORGES, C. P. ; FREIRE, D. M. G. Oxygen-controlled Biosurfactant Production in a Bench Scale Bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 147: 33-45, 2008.

KUMAR, C.G.; JOO, SH.; CHOI, JW.; KOO, YM.; CHANG, CS. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp. I-450. **Enzyme Microbial Technology**, 34: 673-681, 2004

KUYUKINA, M.S.; IVSHINA, I.B.; MAKAROV, S.O.; LITVINENKO, L.V.; CUNNINGHAM, C.J.; PHILP, J.C. Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. **Environmental International**, 31: 155-161, 2005.

KUYUKINA, M.S.; IVSHINA, I.B.; PHILP, J.C.; CHRISTOFI, N.; DUNBAR, S.A.; RITCHKOVA, M.I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal Microbiology Methods**, 46: 149-156, 2001.

LANG, S. E PHILP, J.C. Surface-active lipids in rhodococci. **Antonie van Leeuwenhoek**, 74: 59-70, 1998.

LIN, E.S. e CHEN, Y.H. Factors affecting mycelial biomass and exopolysaccharide production in submerged cultivation of *Antrodia cinnamomea* using complex media. **Bioresource Technology**, 98: 2511-2417, 2007.

LIN, S.C. Biosurfactants: Recent Advances. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, 66: 109 - 20, 1996.

LOAËC, M.; OLIER, R.; GUEZENNEC, J. Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. **Water Research**, 31: 1171-1179, 1997.

LOWRY, H.; ROSEBROUTGH, N. J.; FARR, A.L.; RANDALL. R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, 193: 265-275, 1951.

MAKKAR , R.S. E CAMEOTRA, S.S. An update on the use unconvntional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, 58:428-434, 2002.

MANCA, M.C.; LAMA, L.; IMPROTA, R.; ESPOSITO, E.; GAMBACORTA, A.; NICOLAUS, B. Chemical composition of two exopolysacchride from *Bacillus thermoantarcticus*. **Appied Environmental Microbiology**, 62: 3265-3269, 1996.

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. **Songklanadarin Journal Science Technology**, 27: 675-683, 2005.

MARIANO, A.P.; BONOTTO, D.M.; ANGELIS, D.F.; PIRÔLLO, M.P.S.; CONTIERO, J. Use of weathered diesel oil as a low-cost raw material for biosurfactant production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 25: 269-274, 2008.

MELO, J.M. de. Avaliação do impacto do aumento das concentrações celulares na biodegradação de resíduos oleosos de petróleo. 2004. Dissertação de Mestrado. Pósgraduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MELO, W.C. Aplicação de biosurfactante de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 na remoção de hidrocarbonetos de borra oleosa da indústria do petróleo. 2005. Dissertação de mestrado. Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MENGISTU, Y.; EDWARDS, C.; SAUNDERS, J.R. Continuous culture studies on the synthesis of capsular polysaccharide by *Klebsiella pneumoniae* K1. **Journal Applied Bacteriology**, 76: 424-430, 1994.

MERCADE, M.E. e MANRESA, M.A. The use of agroindustrial by-products from biosurfactant production. **JAOCs**, 71: 61-67, 1994.

MERRICK, M.J. e EDWARDS, R.A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiological Reviews**, 59: 604-622, 1995.

MOON, SH.; PARK, CS.; KIM, YJ.; PARK, YI. Biosorption isotherms of Pb (II) and Zn (II) on Pestan, an extracellular polysaccharide, of *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P. **Process Biochemistry/ In Press**.

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

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. Enhanced biosurfactant production by a mutant *Bacillus subtilis* strain. **Applied Environmental Microbiology**, 31:486-89,1989.

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. **Journal Hazardous Materials**, 85: 111-25, 2001.

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. On the use of biosurfactants for the removal of heavy metals from oil-contaminated soil. **Environmental Progress**, 18:31-35,1999.

MUTALIK, S.R.; VAIDYA, B.K.; JOSHI, R.M.; DEAIS, K.M.; NENE, S.N. Use of response surface optimization for the production of biosurfactante from *Rhodococcus* spp. MTCC2574. **Bioresource Technology**, 99: 7875-7888, 2008.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T. K.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: properties, commercial production and application. **Current Science**, 94: 736-747, 2008.

NEILSON, J.W.; ARTIOLA, J.F.; MAIER, R.M. Characterization of lead removal from contaminated soils by non-toxic soil-washing agents. **Journal of Environmental Quality**, 32: 899-908, 2003.

NEU, T.R.e PORALLA, K. Emulsifying agent from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic surfaces. **Applied Microbiology Biotechnology**, 32: 521-25, 1990.

NEU, T.R; DENGLER, T.; JANN, B; PORALLA, K. Structural studies of an emulsion-stabilizin exopolysaccharide produced by an adhesive, hydrophobic *Rhodococcus* strain. **Journal General Microbiology**, 138: 2531-2537, 1992.

NIESHER, S.; WRAY, V.; LANG, S.; KASCHABEK, S.R.; SCHLÖMANN, M. Identification and structural characterization of novel trehalose dinocardiomycolates from n-alkane-grown *Rhodococcus opacus* 1CP. **Applied Microbiology Biotechnology**, 70: 605-611, 2006.

NITSCHKE, M. E PASTORE,G.M. Biosurfactante: propriedades e aplicações. **Química Nova**, 25 (5): 772-76, 2002.

NITSCHKE, M. E PASTORE,G.M. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using cassava-processing effluent. **Applied Biochemistry Biotechnology**, 112: 163- 72, 2004.

NOORDMAN, W e JANSSEN, D.B. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, 68: 4502-4508, 2002.

OBERBREMER, A ; MUHLLER-HURTIG,R.; WAGNER, F. Effect Of Addition Of Microbial Surfactant On Hydrocarbon Degradation In Soil Population In A Stirred Reactor. **Applied Environmental Biotechnology**, 32:85-489, 1990.

PACHECO, G. J. Produção de biossurfactantes por *Rhodococcus erythropolis* e sua aplicação na remoção de óleo de sedimentos arenosos. Rio de Janeiro, 2008. (Dissertação de Mestrado - Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro).

PERRY, M.B.; MAC LEAN, L.L.; PATRAUCHAN, M.A.; VINOGRADOV, E. The structure of the exocellular polysaccharide produced by *Rhodococcus* sp. RHA1. **Carbohydrate Research**, 342: 2223-2229, 2007.

PHILP J.C. e col. Alkanotrophic *Rhodococcus ruber* as a biosurfactant producer. **Applied Microbiology Biotechnology**, 59:318-324, 2002.

PIROG, T. P.; SHEVCHUK, T.A.; VOLOSHINA, I. N. AND KARPENKO, E. V. Production of surfactants by *Rhodococcus erythropolis* strain EK-1, grown on hydrophilic and hydrophobic substrates. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 40, 544-550, 2004.

PORTER, M.R. Handbook of Surfactants. **New York: Chapman & Hall**, 2 ed^a, 1994.

RAHMAN, K.S.M.; BANAT, I.M.; THAHIRA, J.; THAYUMANAVAN, T.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. **Bioresource Technology**, 81: 25-32, 2002.

RAHMAN, P.K.S.M. e GAKPE, E. Production, characterization and applications of biosurfactants-review. **Biotechnology**, 7: 360-370, 2008.

RAPP, P.; BECK, H., WAGNER, F. Formation of exopolysaccharides by *Rhodococcus erythropolis* and partial characterization of a heteropolysaccharide of high molecular weight. **European Journal Applied Microbiology Biotechnology**, 7: 67-78, 1979b.

RAPP. P.; BOCK, H.; WRAY, V. WAGNER, F. Formation, isolation and characterization of Trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. **J. Gen. Microbiol.**, 115: 491-503, 1979a.

REIS, F. A, SERVULO, E.F.; De FRANCA F.P. Lipopeptide surfactant production by *Bacillus subtilis* grow on low-cost raw material. **Applied Biochemistry Biotechnology**, 115: 899-912, 2004.

RENNER, R. European Bans On Surfactant Trigger Transatlantic Debate. **Environmental Science Technology**, 31: 316A - 20A, 1997.

RISTAU, E. e WAGNER, F. Formation of novel anionic trehalose-tetraesters from *Rhodococcus erythropolis* under growth limiting condition. **Biotechnology Letters**, 5: 95-100, 1983.

RODRIGUES, L.; BANAT, I.M.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Biosurfactants: potential applications in medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 57: 609-618, 2006.

ROSENBERG, E e RON, E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, 52:154-162, 1999.

SALIM, V.M.; BORGES, C.P.; ALVES, T.L.M. **Fenômenos Interfaciais**. Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2003. 10 p. (Disciplina de cadeira do PEQ).

SALLAM, K.I.; MITANI, Y.; TAMURA, T. Construction of random transposition mutagenesis system in *Rhodococcus erythropolis* using IS1415. **Journal Biotechnology**, 121: 13-22, 2006.

SANTA ANNA, L.M. Produção de raminolipídeos e sua aplicação na remediação de solos impactados por óleo. Rio de Janeiro, 2005. (**Tese de Doutorado** – Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos/ Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro).

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 biosurfactans from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environmental. **Brazilian Journal Chemistry Engineering**. 19: 159- 166, 2002.

SANTA ANNA, L.M.M.; SORIANO, A.U.; GOMES, A.C.; MENEZES, E.P.; GUTARRA, M.L.E.; FREIRE, D.M.G.; PEREIRA JR, N. Use of biosurfactant in the removal of oil from contaminated sandy soil. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, 82: 687-691, 2007.

SANTOS, A.S.; SAMPAIO, A.P.W.; VASQUEZ, G.S.; SANTA ANNA, L.M.; PEREIRA JR, N.; FREIRE, D.M.G. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, 98-100, 2002.

SCHEIBENBOGEN, K., ZYTNER, R. G., LEE, H., TREVORS, J. T. Enhanced removal of selected hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants and some chemical surfactants. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, 59: 53 - 9, 1994.

SINGER, V.M.E. e FINNERTY, W.R. Physiology of biosurfactant by *Rhodococcus* species H13-A. **Canadian Journal of Microbiology**, 36: 741-745, 1990.

SINGH, A.; VAN HAMME, J.D.; WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnol. Adv.** 25: 99-121, 2007.

SINGH, P. e CAMEOTRA, S.S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends Biotechnology**, 22: 142-146, 2004.

SOKOLOVSKÁ, I.; ROZENBERG, R.; RIEZ, C.; ROUXHET, P.G; AGATHOS, S. N; WATTIAU, P. Carbon source-induced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* E1. **Applied Environmental Microbiology**,69:7019-7027,2003.

SPILBORGHS, M.C.F. Biorremediação De Aquíferos Contaminados Com Hidrocarbonetos. São Paulo, 1997. (Dissertação de Mestrado - Instituto de Geociências - Universidade De São Paulo)

SUTCLIFFE, I.C. Cell envelope composition and organization in the genus *Rhodococcus*. **Antonie van Leeuwenhoek** 74: 49-58, 1998.

TULEVA, B.; CHRISTOVA, N.; COHEN, R.; STOEV, G.; STOINEVA, I. Production and structural elucidation of trehalose tetraesters (biosurfactants) from a novel alkanotrophic *Rhodococcus wratislaviensis* strain. **Journal Applied Microbiology**, 104: 1703-1710, 2008.

URAI, M.; ANZAI, H.; OGIHARA, J.; IWABUCHI, N.; HARAYAMA, S.; SUNAIRI, M.; NAKAJIMA, M. Structural analysis of an extracellular polysaccharide produced by *Rhodococcus rhodochrous* strain S-2. **Carbohydrate Research**, 341: 766-775, 2006.

URAI, M.; ANZAI, H.; OGIHARA, J.; IWABUCHI, N.; SUNAIRI, M.; NAKAJIMA, M. A novel moisture-absorbing extracellular polysaccharide from *Rhodococcus rhodochrous* SM-1. **Actinomyetologica**, 16: 26-31, 2002.

URAI, M.; ANZAI, H.; OGIHARA, J.; IWABUCHI, N.; SUNAIRI, M.; NAKAJIMA, M. A novel viscous extracellular polysaccharide containing fatty acids from *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 53968. **Actinomyetologica**, 18, 15-17, 2006.

URAI, M.; YOSHIKAWA, H.; ANZAI, H.; OGIHARA, J.; IWABUCHI, N.; HARAYAMA, S.; SUNAIRI, M.; NAKAJIMA, M. Structural analysis of mucoidan, an acidic extracellular polysaccharide produced by a pristane-assimilating marine bacterium, *Rhodococcus erythropolis* PR4. **Carbohydrate Research**, 342: 9270932, 2007.

URUM, K.; GRIGSON, S.; PEKDEMIR, T.; MCMENAMY, S. A comparison of the efficiency of different surfactants for removal of crude oil from contaminated soils. **Chemosphere** 62: 1403-1410, 2006.

URUM, K.; PEKDEMIR, T.; COPUR M. Optimum conditions for washing of crude oilcontaminated soil with biosurfactant solutions. **Trans Chem**, 81: 203-209, 2003.

VIEIRA,R.H.S.F. e VOLESKY, B. Biosorption: a solution to pollution? **International Microbiology**, 3: 17-24, 2000.

WAGNER, F.; B., BEHRENDT, U., BOCK, H., KRETSCHMER, A., LANG, S., SYLDATK, C. (1983), In *Microbial enhanced oil recovery*, Zajic, J. E.; Cooper, D. G.; Jack, T. R.; Kosaric, N. (eds), Pennwell, Tulsa, Okla, pp 55-60.

WAINWRIGHT, M. e PUGH, G.F.F. The effect of three fungicides on nitrification and ammonification in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, 5, 577-584, 1973.

WEI, YH. e CHU, IM. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Enzyme Microbial Technology**, 22: 724-28, 1998.

WEI, Y-H.; WANG, L-F.; CHANGY, J-S.; KUNG, S-S. Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. **Journal Bioscience Bioeng.** 96: 174-178, 2003.

WHANG, L.M.; KIU, P.W.G.; MA, C.D.; CHENG. Application of biosurfactants, rhamnolipids, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. **Journal of Hazardous Materials**, 151: 155- 163, 2008.

WHYTE, L. G.; SCHULTZ, A.; VAN BEILEN, J. B.; LUZ, A. P.; PELLIZARI, V.; LABBÉ, D.; GREER, C. W. Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils **FEMS Microbiology Ecology**, 41:141-150, 2002.

WHYTE, L.G.; SLAGMAN, S.J.; PIETRANTONIO, F.; BOURBONNIÈRE, L.; KOVAL, S.F.;LAWRENCE, J.R.; INNISS, W.E.; GREER, C.W. Physiological adaptations involved in alkane assimilation at a low temperature by *Rhodococcus* sp. Strain Q15. **Applied Environmental Microbiology**, 65(7): 2961-68, 1999.

WILLUMSEN, P. A; KARLSON, U. Screening Of Bacteria, Isolated From PAH-Contaminated Soils, For Production Of Biosurfactants And Bioemulsifiers. **Biodegradation**, 7: 415 - 23, 1997.

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

ZAJIC, J. E. e SEFFENS, W. Biosurfactants. **CRC Critical Rev. In Biotechnology**, 1: 87-107, 1984.