

JOEL ALEXANDRE MEIRA

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR FERMENTAÇÃO NO
ESTADO SÓLIDO E DESENVOLVIMENTO DE APLICAÇÕES PARA
TRATAMENTO DE SOLOS CONTAMINADOS POR
HIDROCARBONETOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química ao Curso de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química-Área de Concentração em Química Orgânica, do Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná.
ORIENTADORA: Prof. Dr^a. NADIA KRIEGER

CURITIBA, 2007

TERMO DE APROVAÇÃO

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO E
DESENVOLVIMENTO DE APLICAÇÕES PARA TRATAMENTO DE SOLOS CONTAMINADOS POR
HIDROCARBONETOS**

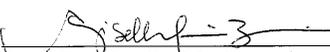
por

JOEL ALEXANDRE MEIRA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:


Prof.^a Dr.^a Nadia Krieger
Dep. de Química – UFPR


Prof.^a Dr.^a Gisella Maria Zanin
Dep. de Eng. Química - UEM


Prof. Dr. Ronilson Vasconcelos Barbosa
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 30 de junho de 2007.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Sueley e Orlando pelo amor e pela força, fundamentais na minha formação.

À minha querida noiva Flávia, pelo carinho, pelo amor, paciência e por me ajudar e me compreender nos momentos difíceis.

Ao meu irmão Guto, pelo apoio e atenção.

À minha orientadora, professora Nadia Krieger, por sua orientação, confiança e estímulo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor David Mitchell do Departamento de Bioquímica da UFPR, pela colaboração em todo o trabalho.

Ao doutorando Doumit Camilios Neto, do Departamento de Bioquímica da UFPR, que muito me ajudou nos experimentos de fermentação em estado sólido.

Ao professor Patrício Peralta Zamora e à doutoranda Elaine Tiburtius do Departamento de Química da UFPR, pela ajuda nos experimentos de tratamento do solo.

Aos meus grandes amigos de laboratório, Alessandra, Arquimedes, Cinthia, Cryshelen, Daniele, Dayane, Doumit, Edneia, Érika, Malu, Marcelo, Safi, Thaís e Virgínia, e pelos momentos de descontração, pela amizade, paciência e força que muito me ajudaram.

Ao Alexandre Emmel SESI-Curitiba pelas análises em cromatografia gasosa sistema headspace.

Aos integrantes da minha banda Guto, Carlos, Filipe, Jonathas e Rafael que me ajudaram muito nos momentos de descontração em que estivemos juntos.

A todos os meus amigos do Departamento de Química da UFPR,

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	2
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIACÕES.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. SURFACTANTES.....	16
2.2. BIOSURFACTANTES.....	18
2.2.1. Ramnolípídeos produzidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
2.2.2. Produção de ramnolípídeos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em Fermentação Submersa (FS).....	27
2.3. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	29
2.2.3. Fermentação em Estado Sólido, uma alternativa para a produção de ramnolípídeos.....	33
2.4. CONTAMINAÇÃO, TOXICIDADE E TRATAMENTO DE SÍTIOS CONTAMINADOS POR PETRÓLEO.....	35
2.4.1. Contaminação por petróleo.....	35
2.4.2. Contaminação por derivados de petróleo.....	36
2.4.3. Tratamento de Sítios Contaminados	39
2.4.4. Processos Físicos e Químicos	40
2.4.5. Utilização de biosurfactantes	42
3. OBJETIVOS.....	48
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1. MICRORGANISMO	49
4.2. PRODUÇÃO DE RAMNOLÍPÍDEOS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	49
4.2.1. Preparo do pré-inóculo.....	49

4.2.2. Cultivos de fermentação em estado sólido.....	49
4.2.3. Extração do biosurfactante.....	50
4.2.4. Extração, purificação e caracterização dos ramnolipídeos produzidos por FES	50
4.3. PRODUÇÃO DO BIOSURFACTANTE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA....	51
4.3.1. Curva de crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em frascos Erlenmeyers ...	51
4.3.2. Curva de crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em biorreator de 5 L.....	52
4.3.3. Produção de ramnolipídeos por fermentação submersa.....	52
4.4. TRATAMENTO DO SOLO COM BIOSURFACTANTE	52
4.4.1. Descrição do solo.....	52
4.4.2 Procedimento experimental:	53
4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS	54
4.5.1. Determinação da tensão superficial	54
4.5.2. Determinação da concentração micelar crítica (CMC).....	54
4.5.3. Medida do índice de emulsificação (<i>E</i>)	55
4.5.4. Dosagem de açúcares pelo método do fenol-sulfúrico	55
4.5.5. Medição de pH.....	56
4.5.6. Cromatografia em camada delgada.....	56
4.5.7. Demanda química de oxigênio.....	57
4.5.8. Cromatografia a gás em sistema <i>headspace</i>	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1. Curva de crescimento <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614 em fermentação submersa em frascos Erlenmeyers e em biorreator.....	58
5.2. Produção de ramnolipídeos por fermentação em estado sólido: ensaios prévios para a escolha do substrato	60
5.3. Produção de ramnolipídeos por fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar	62
5.3.1. Comparação da produção de ramnolipídeos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em fermentação no estado sólido e fermentação submersa	63
5.3.2. Cinética da produção de ramnolipídeos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em fermentação no estado sólido.....	66
5.3.3. Efeito da composição do meio umedecedor na produção de ramnolipídeos por fermentação no estado sólido.....	68
5.4. DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	70
5.4.1. Concentração Micelar Crítica (CMC).....	70

5.4.2. Índice de emulsificação (<i>E</i>)	71
5.5. TRATAMENTO DE SOLOS CONTAMINADOS COM HIDROCARBONETOS	72
5.5.1 Verificação da eficiência do biosurfactante por determinação da demanda química de oxigênio (DQO) dos extratos aquosos do solo.....	72
5.5.2 Verificação da eficiência do biosurfactante por determinação de hidrocarbonetos voláteis por cromatografia a gás sistema <i>headspace</i>	74
6. CONCLUSÕES.....	76
7. TRABALHOS FUTUROS	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Tensão superficial, tensão interfacial e solubilidade em função da concentração do surfactante (CMC: concentração micelar crítica). Fonte: MULLIGAN (2001).16
- Figura 2. Estrutura química de alguns biosurfactantes. (Fonte: CAMEOTRA & MAKKAR, 1998).21
- Figura 3. Ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*. Fonte: (SOBERÓN-CHÁVEZ *et al.*, 2005)23
- Figura 4. Curva padrão de açúcares totais por ramnose (mg/L) contra absorvância a 480 nm, construída utilizando o método de DUBOIS *et al.*, (1956).56
- Figura 5. Cinética de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614. Meio de cultura (por L): 3,0 g KH₂PO₄; 7,0 g K₂HPO₄; 0,2 g MgSO₄.7H₂O, 1,0 g (NH₄)₂SO₄ e 3% v/v de glicerol. Em (▲) Erlenmeyers, 50 mL de meio, 30 °C e 200 rpm e (■) Biorreator Bioflo III, 3,5 L de meio 30°C, 200 rpm, aeração 3,0 L/min.58
- Figura 6. Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 (Fermentação submersa) em biorreator (Bioflo-III Fermentor – New Brunswick Scientific), mostrando a grande formação de espumas com menos de 10 h de fermentação. Meio e condições de cultivo ver Figura 5.59
- Figura 7. Diminuição da tensão superficial do extrato aquoso de sólidos fermentados por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614: 10 g do substrato seco umedecidos com meio contendo por litro: 3,0 g KH₂PO₄; 7,0 g K₂HPO₄; 0,2 g MgSO₄.7H₂O, 1,0 g (NH₄)₂SO₄ e 3% v/v glicerol a 30°C; umidade 85% para o bagaço de cana-de-açúcar e 70% para os demais.: (●) farelo de canola; (□) farelo de algodão; (▲) farelo de soja; (◆) farelo de girassol e (■) bagaço de cana-de-açúcar.61
- Figura 8. Variação da tensão superficial e do teor de ramnolipídeos durante a produção de biosurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 por fermentação em estado sólido utilizando como substrato o bagaço de cana-de-açúcar. (■) Concentração de Ramnose e (▲) tensão superficial. Experimentos realizados em triplicata em Erlenmeyers de 250 mL contendo 10 g de bagaço de cana-de-açúcar seco umedecido com meio contendo por litro: 3,0 g KH₂PO₄; 7,0 g K₂HPO₄; 0,2 g MgSO₄.7H₂O, 1,0 g (NH₄)₂SO₄ e 3% v/v de glicerol, incubados em estufa a 30 °C.64
- Figura 9. Abaixamento da tensão superficial do extrato produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 em (■) fermentação submersa e (▲) em fermentação em estado sólido utilizando como substrato o bagaço de cana-de-açúcar. Fermentação submersa: Experimento realizados em triplicata em frascos Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio contendo por litro: 3,0 g KH₂PO₄; 7,0 g K₂HPO₄; 0,2 g MgSO₄.7H₂O, 1,0 g (NH₄)₂SO₄ e 3% (v/v) de glicerol, incubados em agitador orbital a 30°C/ 200 rpm. Fermentação em estado sólido: Experimento realizados em triplicata em frascos Erlenmeyers de 250 mL com 10 g de bagaço de cana-de-açúcar seco umedecidos com 50 mL do mesmo meio da fermentação submersa, umidade de 85% e incubados em estufa a 30°C.65

Figura 10. Comparação da produção de ramnolipídeos de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 por (♦) fermentação em estado sólido utilizando com substrato o bagaço de cana-de-açúcar e por (■) fermentação submersa. Fermentação submersa: Experimento realizados em triplicata em frascos Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio contendo por litro: 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3% (v/v) de glicerol, incubados em agitador orbital a 30°C/ 200 rpm. Fermentação em estado sólido: Experimento realizados em triplicata em frascos Erlenmeyers de 250 mL com 10 g de bagaço de cana-de-açúcar seco umedecidos com 50 mL do mesmo meio da fermentação submersa, umidade de 85% e incubados em estufa a 30°C.66

Figura 11. Cinética de produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 por fermentação em estado sólido utilizando como substrato o bagaço de cana-de-açúcar. Fermentação em estado sólido: Experimento realizados em triplicata em frascos Erlenmeyers de 250 mL com 10 g de bagaço de cana-de-açúcar seco umedecidos com 50 mL de meio contendo por litro: 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3% (v/v) de glicerol, umidade de 85% e incubados em estufa a 30°C.67

Figura 12. Produtividade de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 por fermentação em estado sólido utilizando como substrato o bagaço de cana-de-açúcar. Fermentação em estado sólido: Experimento realizados em triplicata em frascos Erlenmeyers de 250 mL com 10 g de bagaço de cana-de-açúcar seco umedecidos com 50 mL de meio contendo por litro: 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3% (v/v) de glicerol, umidade de 85% e incubados em estufa a 30°C.68

Figura 13. Efeito da composição da solução umedecedora na produção de ramnolipídeos por fermentação no estado sólido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614. Experimentos em Erlenmeyers de 250 mL contendo 10 g de bagaço de cana-de-açúcar seco umedecido com: (1) glicerol (grau analítico) + sais; (2) glicerol (grau analítico) + tampão; (3) glicerol (grau analítico) + H_2O ; (4) glicerina loura + sais; (5) glicerina loura + tampão e (6) glicerina loura + H_2O69

Figura 14. Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) dos ramnolipídeos produzidos por fermentação em estado sólido utilizando como substrato o bagaço de cana-de-açúcar por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614, em função da tensão superficial (mN/m), utilizando-se diluições sucessivas do extrato purificado.70

Figura 15. Determinação do Índice de Emulsificação (E_{24}) após 24 h do biosurfactante obtido de um extrato purificado (1,2 g/L) produzido por FES frente a diferentes hidrocarbonetos.71

Figura 16. Eficiência da lavagem de solos contaminados com gasolina com o biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 em fermentação no estado sólido, avaliada pela determinação da demanda química de oxigênio dos extratos aquosos do solo. Ensaio com 20 g de solo e: (1) BS, ramnolipídeos + 2% (v/m) gasolina; (2) controle água + 2% (v/m) gasolina; (3) Controle BS, ramnolipídeos + 0% gasolina; (4) Controle, água + 0% gasolina. Os Erlenmeyers ficaram em agitador orbital a 25°C por 24 h e 48 h.73

Figura 17. Determinação dos hidrocarbonetos voláteis por cromatografia a gás em sistema *headspace* de amostras da lavagem do solo com soluções do biosurfactante produzidos por

Pseudomonas aeruginosa UFPEDA 614. Condições: 20 g de solo contaminado 2% (v/m) de gasolina e com lavado com: ■ água (controle), ■ BS: ramnolipídeos.74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades de alguns surfactantes sintéticos	18
Tabela 2. Usos sugeridos para tensioativos não-iônicos em relação aos valores de BHL (balanço hidrofílico-lipofílico).....	18
Tabela 3. Principais classes de biosurfactantes e microrganismos envolvidos.	20
Tabela 4. Propriedades de ramnolipídeos produzidos por espécies do gênero <i>Pseudomonas</i>	25
Tabela 5. Produção de ramnolipídeos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em fermentação submersa	28
Tabela 6. Exemplos de substratos e das aplicações da fermentação no estado sólido (FES).....	31
Tabela 7. Tecnologias de tratamento de compostos orgânicos por processos físico-químicos, térmicos e de disposição.....	41
Tabela 8. Biosurfactantes e ramos industriais de aplicações	43
Tabela 9. Efeito da adição de biosurfactantes na recuperação de óleo (MEOR) em escala laboratorial	44
Tabela 10. Dados da composição das amostras de solos fornecidas pela EMBRAPA Florestas, Colombo PR	53
Tabela 11. Composição de sólidos totais e de açúcares totais e redutores do bagaço de cana-de-açúcar (Fonte: PITARELO, 2006).	62

LISTA DE ABREVIACOES

ANP	Agência Nacional de Petróleo
BS	Biosurfactantes
BHL	Balanço hidrofílico-lipofílico
BTX	Benzeno, tolueno e xilenos
C/N	Relação carbono/nitrogênio
CCD	Cromatografia de camada delgada
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	Concentração micelar crítica
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DQO	Demanda química de oxigênio
E	Índice de emulsificação
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI-MS	Electrospray-ionisation-mass-spectrometry
FES	Fermentação em estado sólido
FS	Fermentação Submersa
GRAS	Generally Recognized as Safe
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LB	Meio de cultura Luria Bertrani
MEOR	Microbiologically Enhanced Oil Recovery
PAHs	Hidrocarbonetos aromáticos polinucleares
Rha-/Rha ₂	Representação de um mono-ramnolípido/di-ramnolípido
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SESI	Serviço Social da Indústria
TI	Tensão interfacial
TS	Tensão superficial

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa UFPEDA 614, isolada em campos petrolíferos do Nordeste Brasileiro, produziu um biosurfactante do tipo ramnolípido, quando cultivada por fermentação em estado sólido utilizando o bagaço de cana-de-açúcar como substrato, enriquecido com solução de sais, glicerol e nitrato de amônio. A produção de ramnolípidos foi 12,5 g/Kg.S.S (grama por quilograma de substrato seco) expressos em ramnose após 12 dias de cultivo. As propriedades físico-químicas do biosurfactante presente no extrato purificado do material fermentado foram examinadas por tensiometria (tensiômetro Kruss modelo K12) e pelo índice de emulsificação do tensioativo contra diferentes compostos apolares (gasolina, diesel, tolueno e querosene) e foram muito semelhantes às obtidas para os ramnolípidos produzidos por fermentação submersa, com valores de concentração micelar crítica de 14,3 mg/L e o melhor índice de emulsificação após 24 h (83%) para a gasolina. A utilização do biosurfactante mostrou-se viável para a lavagem de solos contaminados com gasolina, sendo 88,0 % mais eficiente do que a água na remoção de hidrocarbonetos voláteis e não voláteis, segundo a determinação por cromatografia gasosa em sistema *headspace* dos eluatos. Quando a matéria orgânica contida nos eluatos dos solos foi avaliada por demanda química de oxigênio (DQO), obteve-se 64,2 % mais de eficiência em relação ao uso da água nas mesmas condições, o que confirma a viabilidade de desenvolvimento de diferentes aplicações, sobretudo as ambientais, desse biosurfactante produzido por FES. A utilização da fermentação no estado sólido usando um resíduo agroindustrial de baixo custo pode viabilizar economicamente as aplicações ambientais de biosurfactantes.

Palavras-Chave: Ramnolípidos; *Pseudomonas aeruginosa*, biosurfactantes, fermentação em estado sólido.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa UFPEDA 614, isolated from a petrol well in Northeast Brazil, produced a rhamnolipid biosurfactant when grown in a solid-state fermentation on a substrate composed of sugar cane bagasse impregnated with a solution of minerals, glycerol and ammonium nitrate. Rhamnolipid levels reached 12.5 g/kg-DS (gram per kilogram of dry substrate) after 12 days. The biosurfactant was extracted from the fermented solid and purified. Its physicochemical properties were then evaluated on the basis of tensiometry (tensiometer Kruss mode K12) and determination of the emulsification index against different apolar compounds (gasoline, diesel, toluene and kerosene). These properties were very similar to those obtained in submerged culture, with a Critical Micellar Concentration of 14.3 mg/L and an emulsification index of 83% against gasoline at 24 h. The biosurfactant was used in the washing of soils contaminated with gasoline, being 88.0% more efficient than water in removing volatile and non-volatile hydrocarbons, as determined on the basis of gas chromatography of the headspace gases of the eluates. The chemical oxygen demands of the organic material in the eluates from the soil demonstrated that washing with a biosurfactant solution was 64.2% more efficient than water under the same conditions. These results suggest that the biosurfactant produced in solid-state fermentation can be used in environmental applications. The use of solid-state fermentation using agroindustrial residues has the potential to make the environmental applications of biosurfactants economically viable.

Keywords: Rhamnolipids; *Pseudomonas aeruginosa*, biosurfactants, solid-state fermentation

1. INTRODUÇÃO

Os biosurfactantes são moléculas anfifílicas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica, produzidos extra ou intracelularmente por microrganismos - bactérias, fungos ou leveduras - durante o processo de fermentação, com a finalidade de facilitar a difusão passiva de substâncias insolúveis em água, para o interior da célula (SANTOS, 1997). Essas moléculas são biodegradáveis, não tóxicas e podem ser produzidas *in situ* (por inoculação do próprio microrganismo no local de atuação do biosurfactante) ou *extra situ* por adição do biosurfactante previamente produzido em outro local (MAKKAR & CAMEOTRA, 1997; CARRILO, 1996).

Nas atividades industriais relacionadas ao petróleo, são várias as aplicações dos biosurfactantes, como por exemplo, na recuperação avançada de óleo, (MEOR, *Microbiologically Enhanced Oil Recovery*), na limpeza de tanques e equipamentos, e na biorremediação de solos e outros ecossistemas contaminados por acidentes de derramamento de óleo. Além disso, podem ser utilizados no melhoramento da qualidade do óleo, na síntese de novos polímeros, cosméticos e produtos relacionados e na síntese de bioplásticos. A utilização *in situ* e *extra situ* de biosurfactantes tem sido bastante estudada e desponta como alternativa viável em alguns campos específicos.

A cepa *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614, utilizada neste trabalho, foi isolada de uma planta petroquímica e, quando cultivada em fermentação submersa (FS) usando como fonte de carbono o glicerol, produz uma mistura de ramnolipídeos. A composição desta mistura foi determinada por ESI-MS (electrospray-ionisation-mass-spectrometry) apresentando 6 homólogos do tipo monoramnolipídeo (Rha-C₁₀-C₁₀; Rha-C₁₀-C₈; Rha-C₈-C₁₀; Rha-C₁₀-C_{12:1}; Rha-C₁₂-C₁₀; Rha-C₁₀-C₁₂) e os seus correspondentes di-ramnolipídeos (MONTEIRO *et al.*, 2007). O biosurfactante produzido por FS mostrou excelentes propriedades tensioativas, promovendo a redução da tensão superficial do meio de cultura para 27,34 mN/m, concentração micelar crítica (CMC) de 13 mg/L, formando

emulsões bastante estáveis (índice de emulsificação, contra o tolueno $E = 86,4\%$ após 24 h) mesmo após 30 dias (contra o tolueno, $E = 60,0\%$) (MONTEIRO *et al.*, 2007). Entretanto, quando se tentou um aumento de escala do processo de FS para biorreator de 5 L, houve uma intensa formação de espumas, mostrando que havia necessidade de se procurar processos alternativos.

Nesse contexto, a proposta deste foi estudar o processo de fermentação em estado sólido (FES) para a produção do biosurfactante por *P. aeruginosa* UFPEDA 614. Esta técnica de fermentação, além de impedir a formação de espumas durante o processo, utiliza resíduos agroindustriais como substrato, o que pode propiciar uma redução dos custos de produção dos biosurfactantes, tornando-os economicamente competitivos com os surfactantes químicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. SURFACTANTES

Os surfactantes, também chamados de tensioativos, emulsificantes ou agentes de interface, são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e de uma porção hidrofílica, geralmente utilizados em produtos comerciais com a finalidade de melhorar a dispersão (ou a solubilização) de materiais hidrofóbicos em água (MULLIGAN & GIBBS, 1993). Com este propósito, a eficácia destes compostos é avaliada em função de algumas propriedades físicas deles próprios e das misturas que estabelecem com a água, como solubilidade, concentração micelar crítica (CMC), tensão superficial e tensão interfacial (Figura 1).

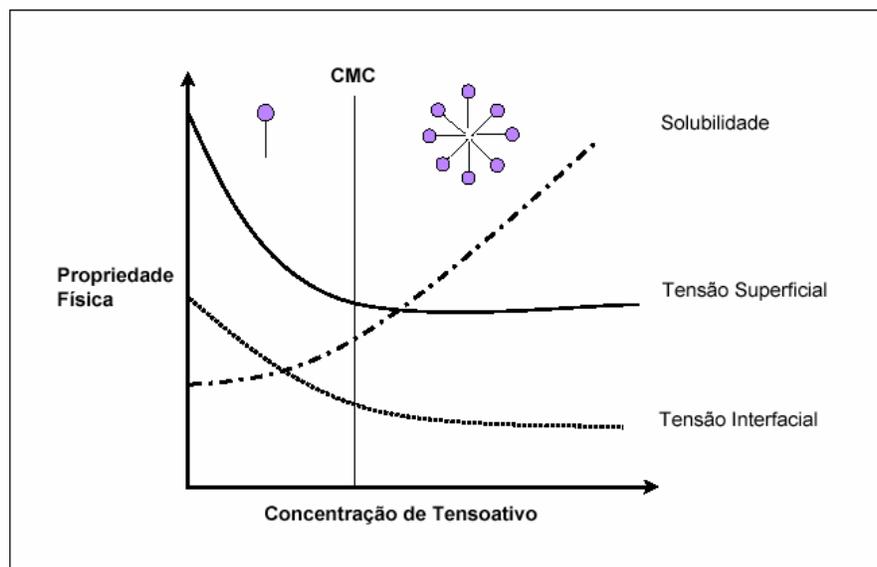


Figura 1. Tensão superficial, tensão interfacial e solubilidade em função da concentração do surfactante (CMC: concentração micelar crítica). Fonte: MULLIGAN *et al*, 2001.

A Figura 1 mostra a relação entre a concentração do emulsificante e as propriedades físicas anteriormente citadas. Em uma emulsão, onde existe um limite interfacial entre duas fases imiscíveis, os surfactantes concentram-se nas interfaces sólido-líquido, líquido-

líquido ou vapor-líquido. A parte hidrofóbica da molécula concentra-se na superfície voltada à fase hidrofóbica, enquanto a porção hidrofílica está orientada para a solução (MULLIGAN, 2005). A tensão superficial, que é uma medida da energia livre da superfície por unidade área requerida para trazer uma molécula à superfície (ROSEN, 1978), correlaciona-se com a concentração do composto ativo na superfície até que a CMC seja alcançada; Assim, a CMC é definida como a concentração mínima necessária para o início da formação da micela (BECHER, 1965). A tensão interfacial é a superfície de separação entre duas substâncias quaisquer. Ao contrário da tensão superficial de um líquido, a tensão interfacial de um par de substâncias pode ser negativa; neste caso a energia potencial de coesão diminui à medida que a área da interface aumenta, e este aumento se produz espontaneamente por ser a adesão entre as moléculas mais intensa do que a coesão entre elas (SOUZA, 1995).

A eficácia de um surfactante é determinada por sua habilidade de diminuir a tensão superficial da água, pois o surfactante interage com a molécula de água e diminui o trabalho requerido para trazer uma molécula à superfície e assim, a tensão superficial é reduzida. Um surfactante eficaz pode diminuir a tensão superficial da água de 72 a 35 mN/m e a tensão interfacial (TI) de n-hexadecano em água de 40 a 1 mN/m. Na prática, a CMC é também a concentração máxima de monômeros de surfactante na água e é influenciada pelo pH, pela temperatura e pela força iônica. Os surfactantes eficientes apresentam uma CMC baixa, pois a concentração de surfactante necessária para reduzir da tensão superficial ao máximo é menor (OBERBREMER *et al.*, 1990; SAMSON *et al.*, 1990). A Tabela 1 apresenta valores de CMC para alguns surfactantes sintéticos.

Tabela 1. Propriedades de alguns surfactantes sintéticos

Surfactante sintético	Estrutura química	Massa molecular	CMC (mg/L)
SDS	Dodecilsulfato de sódio	288	2420
DBS	Dodecilbenzenosulfonato de sódio	324	390
Steol CS-330	Laurilsulfato de sódio polietoxilado	442	1460
DPDS	Disulfato Difenil oxido polietoxilado sorbitan	642	4040

FONTE: DESHPANDE *et al.*, (1998).

Uma outra característica importante dos surfactantes e biosurfactantes é o balanço hidrofílico-lipofílico (BHL), que é conferido pela composição da mistura. BHL é uma expressão numérica relativa da atração simultânea do emulsificante pela água e pelo óleo, cujo valor informa a solubilidade do emulsificante em óleo ou água. Em geral, as moléculas com baixo BHL são lipofílicas, enquanto as de BHL alto são mais solúveis em água (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002). A Tabela 2 ilustra as aplicações de tensoativos não-iônicos com diferentes valores de BHL e seus usos.

Tabela 2. Usos sugeridos para tensoativos não-iônicos em relação aos valores de BHL (balanço hidrofílico-lipofílico)

BHL	USOS
< 3	Filmes de superfície
3 – 6	Emulsificantes água em óleo (a/o)
7 – 9	Espalhamento de líquidos em superfícies sólidas
8 -15	Emulsificantes óleo em água (o/a)
13 -15	Detergentes
15 -18	Solubilidade

Fonte: CHRISTOFI & IVSHINA, 2002.

2.2. BIOSURFACTANTES

Os biosurfactantes constituem um grupo de diversas moléculas sintetizadas por microrganismos (NITSCHKE *et al.*, 2005a; CAMEOTRA & MAKKAR, 2004). Estes

compostos oferecem muitas vantagens em relação aos surfactantes de origem química, tais como: (a) aceitabilidade ecológica, pois são potencialmente aplicáveis em proteção ambiental (RAHMAN *et al.*, 2002) pela sua baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (COSTA *et al.*, 2006; MAKKAR & CAMEOTRA, 2002; RAHMAN *et al.*, 2002); (b) são efetivos em ampla faixa de temperatura e pH (BANAT *et al.*, 2000; MULLIGAN, 2005); (c) podem ser produzidos a partir de fontes renováveis (NITSCHKE *et al.*, 2005b; BENINCASA *et al.*, 2002) (d) podem ser mais eficientes que os surfactantes químicos (BANAT, 1995).

Segundo ZAJIC & SEFFENS (1984), os biosurfactantes podem ser classificados em cinco grupos: (1) glicolipídeos; (2) lipopolissacarídeos; (3) lipopeptídeos; (4) fosfolipídeos; (5) ácidos graxos e lipídeos neutros (Tabela 3). Desta forma, cada grupo de biosurfactantes apresenta propriedades e funções fisiológicas diferentes, sendo que a maioria é constituída por porções hidrofílicas e hidrofóbicas distintas. A maior parte dos biosurfactantes é dos tipos aniônicos ou neutros; alguns são catiônicos, como, por exemplo, aqueles que contêm grupos amino. A parte hidrofóbica da molécula pode ser formada por ácidos graxos de cadeia longa, hidroxí-ácidos graxos ou por α -alquil- β -hidroxí ácidos graxos. A porção hidrofílica pode ser composta por carboidratos, aminoácidos, peptídeos cíclicos, fosfato, ácido carboxílicos ou um álcoois (Figura 2) (JACOBUCCI, 2000).

Uma grande variedade de microrganismos pode produzir biosurfactantes, sendo os mais conhecidos aqueles apresentados na Tabela 3. Assim como a sua composição pode variar, as propriedades físico-químicas dos biosurfactantes também é bastante variável: os valores de CMC podem estar situados numa faixa de 1 a 200 mg/L, enquanto para surfactantes sintéticos a CMC apresenta valores em uma faixa bem mais elevada (Tabela 1) podendo chegar a valores como de 2420 mg/L para o SDS (dodecilsulfato de sódio) um surfactante sintético bem conhecido, e suas massas molares situam-se entre 500 a 1500 Da (VAN HAMME *et al.*, 2006).

Tabela 3. Principais classes de biosurfactantes e microrganismos envolvidos.

TIPO DE BIOSURFACTANTE	MICROORGANISMO
Glicolipídeos	
-ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
-soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola; T. apicola</i>
-trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serravetina	<i>Serratia marcescens</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>

Fonte: NITSCHKE & PASTORE, 2002.

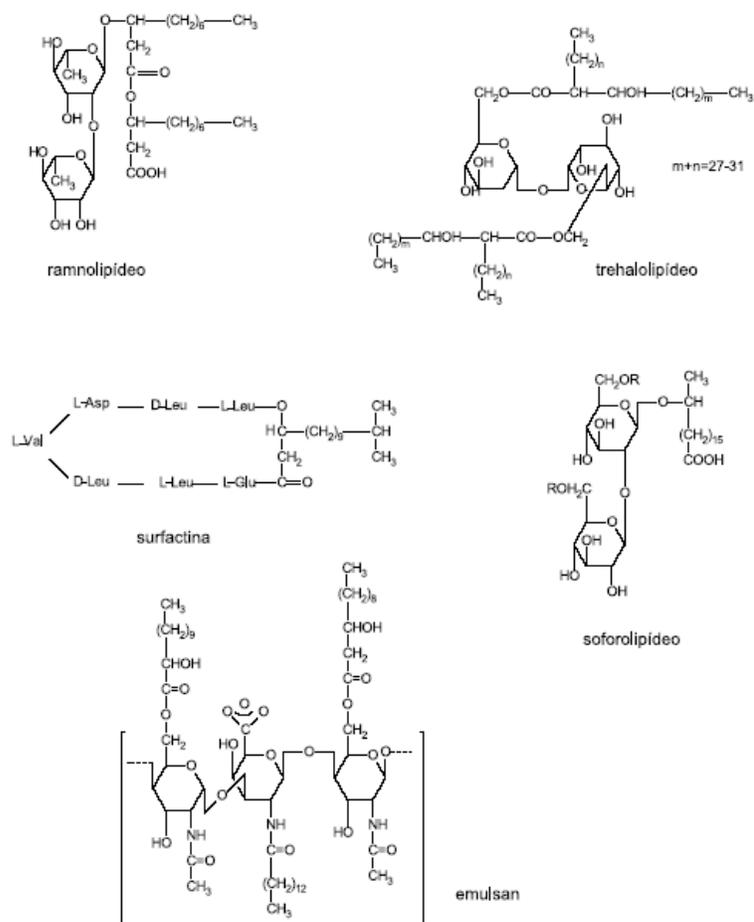


Figura 2. Estrutura química de alguns biosurfactantes. (Fonte: CAMEOTRA & MAKKAR, 1998).

A sua eficácia depende, como já foi dito, das suas propriedades funcionais. Entretanto, surfactantes produzidos por via biotecnológica apresentam algumas vantagens sobre os surfactantes sintéticos, como a biodegradabilidade e a biocompatibilidade (MAIER & SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000). Por exemplo, os glicolipídios produzidos por *Rhodococcus* 413A são 50% menos tóxicos do que o Tween-80 (MONOOLEATO DE SORBITAN 20 EO) em testes de solubilização do naftaleno (KANGA *et al.*, 1997).

Embora a maioria dos organismos produtores de biosurfactantes sejam aeróbios, existem alguns exemplos de produtores anaeróbios. *Bacillus licheniformis* Jf-2 é um exemplo que, por ser anaeróbio, vem sendo bem estudado *in situ* para a recuperação do óleo ou descontaminação do solo (JAVAHERI *et al.*, 1985).

As seções que se seguem tratarão especificamente sobre os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, que são os glicolipídeos-foco deste trabalho. A escolha por esses biosurfactantes produzidos por *P. aeruginosa* é justificada pelo conjunto de características de produção e de aplicação apresentado pelos ramnolipídeos. Estas características serão abordadas com maiores detalhes na próxima seção.

2.2.1. Ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*

Trabalhos pioneiros de JARVIS & JOHNSON (1949) mostraram que a bactéria *P. aeruginosa* cultivada em meio com glicerol produzia um glicolipídeo, com uma porção hidrofóbica composta de ácido graxo e uma porção hidrofílica composta por uma ou duas ramnoses. Mais tarde, foram reportados dois grupos de ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa*, os mono e di-ramnolipídeos (Figura 3), constituídos, respectivamente, de uma unidade de ramnose e duas de ácido β -hidroxidecanoato (C_{10}) ou duas unidades de ramnose ligadas a duas unidades de ácido β -hidroxidecanoato (DÉZIEL *et al.*, 2000; LANG e WULLBRANDT, 1999). Também foi relatada a existência de ramnolipídeos que apresentam ácidos graxos de diferentes comprimentos de cadeia (C_8 , C_{10} , C_{14}), com diferentes graus de insaturação, além da presença de anéis de ramnose com ramificações (SOBERÓN-CHÁVEZ *et al.*, 2005; LANG & WULLBRANDT, 1999).

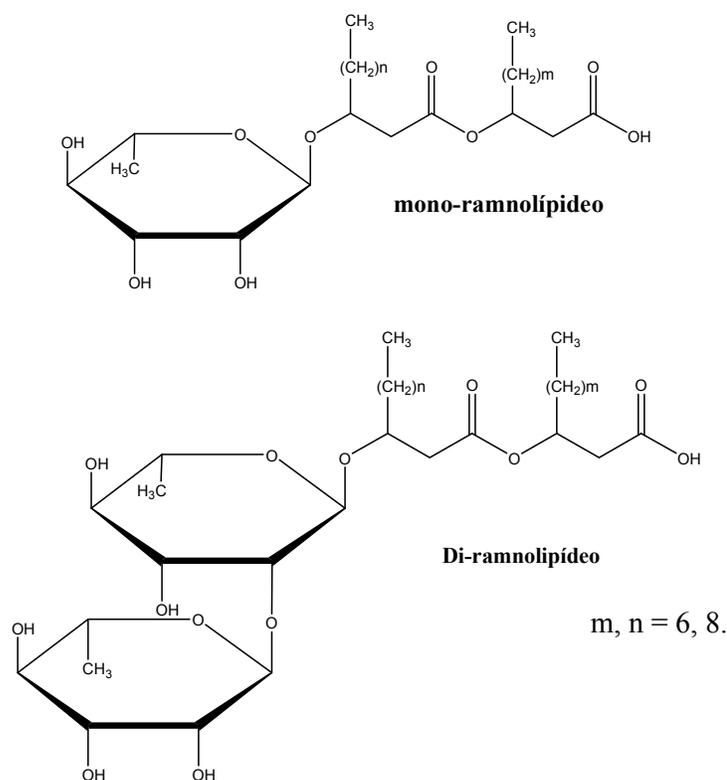


Figura 3. Ramnolípídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*. Fonte: (SOBERÓN-CHÁVEZ *et al.*, 2005).

Atualmente, pela utilização de métodos mais sofisticados de análise, sabe-se que o biosurfactante produzido por *P. aeruginosa* é composto por uma mistura de homólogos de ramnolípídeos, cuja composição depende de vários fatores, entre eles, da cepa, das condições e meios de cultura e da idade da cultura. A Tabela 4 mostra que muitos trabalhos foram publicados sobre a produção de ramnolípídeos por cepas de *Pseudomonas* e sobre o estudo da composição da mistura e suas propriedades físico-químicas. Por exemplo, MONTEIRO *et al.*, (2007) com uma mistura de 12 homólogos obteve uma TS de 27,3 mN/m e uma CMC de 13,9 mg/L e já ABALOS *et al.*, 2001 com uma mistura de seis homólogos obteve uma TS de 27,3 mN/m assim como MONTEIRO *et al.* (2007), mas com uma CMC de 234 mg/L, mostrando que diferentes misturas de ramnolípídeos podem levar a diferentes propriedades físico-químicas.

Os ramnolipídeos são considerados como metabólitos secundários, já que a síntese desses compostos coincide com o início da fase estacionária de crescimento da bactéria (DÉZIEL *et al.*, 2000). A razão da síntese dos biosurfactantes pelas bactérias ainda não está bem esclarecida; todavia estes compostos estão relacionados à captação de substratos hidrofóbicos (DAS & MUKHERJEE, 2005), e ao aumento da difusão de substâncias insolúveis para o interior da célula (MULLIGAN, 2005; CAMEOTRA & MAKKAR, 1998).

Biosurfactantes são também importantes para a movimentação (movimentando grandes quantidades de células), interações célula-célula (formação, manutenção e maturação) e diferenciação celular, ascensão de substratos (pelo contato e pseudo-solubilização interfacial dos substratos) (VAN HAMME *et al.*, 2006). Além disso, a produção de ramnolipídeos parece estar também ligada a fatores de virulência. A síntese dos ramnolipídeos, assim como a dos fatores de virulência, é regulada por um sistema genético muito complexo (LEE *et al.*, 2004; SMITH & IGLEWSKI, 2003).

Os ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* (Tabela 4) estão entre os biosurfactantes mais estudados (LEE *et al.*, 2004) e representam uma das mais importantes classes de surfactantes microbianos, pois possuem excelentes propriedades tensioativas. Podem ser produzidos em altas concentrações (em fermentação submersa até 100 g/L, aproximadamente) e conseqüentemente apresentam um bom potencial de exploração comercial. Outra vantagem dos ramnolipídeos é que podem ser produzidos a partir de fontes de relativo baixo custo, substratos hidrofílicos e hidrofóbicos, como carboidratos, óleos vegetais e hidrocarbonetos (HOLMBERG, 2001) ou mesmo a partir de efluentes de indústrias de alimentos (NITSCHKE *et al.*, 2005b; MAKKAR & CAMEOTRA, 2002).

Dentre as propriedades tensioativas, os ramnolipídeos são capazes de reduzir a tensão superficial (TS) da água de 72 mN/m para 25 a 30 mN/m, e apresentam uma CMC que varia entre 13 a 54 mg/L (MONTEIRO *et al.*, 2007). Os ramnolipídeos não são os

biosurfactantes com as melhores propriedades físico-químicas, ou seja, não apresentam a maior redução da TS ou a menor CMC. Entretanto, apresentam alta atividade emulsificante e pequena atividade antibiótica, além de serem menos retidos no solo do que os surfactantes químicos, tanto não iônicos como catiônicos, devido à carga superficial negativa do solo; dessa forma mostram-se como uma alternativa para aplicação em biorremediação (BORDAS *et al.*, 2005; MULLIGAN, 2005).

Tabela 4. Propriedades de ramnolipídeos produzidos por espécies do gênero *Pseudomonas*

CEPA	TIPO DE RAMNOLIPÍDEO	TS (mN/m)	TI (mN/m)	CMC (mg/L)	REFERÊNCIAS
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614	RL MISTURAS ^E	27,3	1	13,9	MONTEIRO <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2	RL MISTURAS	32,8	1 ^A	108,8	HABA <i>et al.</i> , 2003
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10	RHA ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	28,8	ND	105,0	ABALOS <i>et al.</i> , 2001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10	RL MISTURAS ^C	27,3	ND	234	ABALOS <i>et al.</i> , 2001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10	RL MISTURAS ^D	26,8	ND	150	ABALOS <i>et al.</i> , 2001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	RL MISTURAS	24,0	1,31 ^B	120	BENINCASA <i>et al.</i> , 2004
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 44T1	RHA-C ₁₀ -C ₁₀	25,0	0,2 ^A	11	PARRA <i>et al.</i> , 1989
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 44T1	RHA ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	25,0	1,0 ^A	11	PARRA <i>et al.</i> , 1989
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM2874	RHA-C ₁₀ -C ₁₀ + RHA ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	26,0	< 1,0 ^B	20	PARRA <i>et al.</i> , 1989
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM2874	RL MISTURA	28,0	< 1,0 ^B	20	SYLDATK & WAGNER, 1985
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM2874	RHA ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	27,0	< 1,0 ^B	10	SYLDATK & WAGNER, 1985
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM2874	RHA ₂ -C ₁₀	30,0	< 1,0 ^B	200	SYLDATK & WAGNER, 1985
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UG-2	RHA-C ₁₀ -C ₁₀ + RHA ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	31,0	ND	53	MATA-SANDOVAL <i>et al.</i> , 2001

a - Contra querosene, **b** - contra hexadecano, **c** - Rha-C10-C10 + Rha2-C10-C10 + Rha-C10-C12 + Rha-C12:1-C10 + Rha-C12:2 + Rha-C8-C2, **d**- Rha2-C10-C10 + Rha-C10-C10 + Rha2-C10-C12 + Rha-C10-C12 + Rha-C12:1-C10 + Rha-C8:2, **e** - Rha-C10-C10; Rha-C10-C8; Rha-C8-C10; Rha-C10-C12:1; Rha-C12-C10; Rha-C10-C12; Rha2-C10-C10; Rha2-C10-C8; Rha2-C8-C10; Rha2-C10-C12:1; Rha2-C12-C10; Rha2-C10-C12, RL - ramnolipídeos, TS - tensão superficial, TI - tensão interfacial, CMC - concentração

micelar crítica. ND- não determinado. FONTE: NITSCHKE *et al.*, 2005a; SOBERÓN-CHAVEZ, 2005; DÉZIEL *et al.*, 2000.

A composição da mistura de ramnolipídeos em um biosurfactante, que, como já foi dito anteriormente, depende da cepa, das condições e meios de cultura, determina suas propriedades de emulsificação e tensioativas. Assim, sabe-se que um anel de L-ramnose confere maior hidrofiliabilidade ao ramnolipídeo, enquanto carbonos adicionais à cadeia de ácido graxo ou maior número de insaturações aumentam sua hidrofobicidade. Alguns autores sugerem que, quanto maior a cadeia de ácidos graxos e mais insaturados forem, maior a chance destas moléculas agregarem-se em micelas, diminuindo a CMC, quando comparadas a misturas de ramnolipídeos ricos em ácidos graxos saturados (cadeia C₁₀) (NITSCHKE *et al.*, 2005a; LANG, 2002).

A predominância de mono ou di-ramnolipídeos e a sua relação com as propriedades físico-químicas da mistura não estão bem esclarecidas, mas algumas evidências podem ser observadas. Por exemplo, os di-ramnolipídeos do tipo Rha₂-C₁₀-C₁₀ geralmente apresentam uma CMC mais baixa (5 mg/L), devido à presença de duas moléculas de açúcar; em contrapartida, alguns mono-ramnolipídeos, como Rha-C₁₀-C₁₀ por exemplo, podem apresentar valores de CMC de 40 mg/L (LANG & WAGNER, 1987), enquanto os Rha-C₁₀ e Rha₂-C₁₀ apresentaram uma CMC de 200 mg/L (NITSCHKE *et al.*, 2005a, LANG, 2002).

A cepa *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614, utilizada neste trabalho, foi isolada de uma planta petroquímica e, quando cultivada em fermentação submersa usando como fonte de carbono o glicerol, produziu uma mistura de ramnolipídeos. Esses tensioativos foram caracterizados por ESI-MS/MS como sendo uma mistura de 12 homólogos: Rha-C₁₀-C₁₀; Rha-C₁₀-C₈; Rha-C₈-C₁₀; Rha-C₁₀-C_{12:1}; Rha-C₁₂-C₁₀; Rha-C₁₀-C₁₂ (mono-ramnolipídeos); Rha₂-C₁₀-C₁₀; Rha₂-C₁₀-C₈; Rha₂-C₈-C₁₀; Rha₂-C₁₀-C_{12:1}; Rha₂-C₁₂-C₁₀; Rha₂-C₁₀-C₁₂ (di-ramnolipídeos). O biosurfactante produzido mostrou excelentes propriedades tensioativas, promovendo a redução da tensão superficial do meio de cultura

para 27,34 mN/m, concentração micelar crítica (CMC) de 13 mg/L, formando emulsões bastante estáveis (índice de emulsificação, contra o tolueno $E = 86,4\%$ após 24 h), mesmo após 30 dias (contra o tolueno, $E = 60,0\%$) (MONTEIRO *et al.*, 2007).

2.2.2. Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em Fermentação Submersa (FS)

Todos os estudos de produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* até hoje reportados na literatura, foram feitos em fermentação submersa (FS). Alguns destes trabalhos estão citados na Tabela 5.

Diferentes fontes de carbono têm sido utilizadas para a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa*, mas parece que há uma necessidade de se manter uma limitação da fonte de nitrogênio (alta relação C/N) para a melhor produção do biosurfactante. GUERRA-SANTOS *et al.* (1984), em um estudo de produção de ramnolipídeos em fermentação contínua, utilizando glucose como fonte de carbono, mostraram que a fonte de carbono é consumida para a multiplicação celular e conseqüente incremento na biomassa, enquanto a limitação de nitrogênio estimula a formação de ramnolipídeos. Segundo MONTEIRO *et al.* (2007) a melhor relação C/N é de 55 para a produção de ramnolipídeos em FS utilizando como fonte de carbono o glicerol, onde se conseguiu uma produção máxima de 3,9 g/L de ramnolipídeos.

Uma cepa de *P. aeruginosa*, isolada de água de lavagem de poços de petróleo do Nordeste do Brasil, foi utilizada para a produção de ramnolipídeos a partir de uma relação C/N de 60/1. Neste estudo foi obtida uma produção de 3,16 g/L de ramnolipídeos utilizando glicerol como fonte de carbono (SANTA ANNA *et al.*, 2002). Num outro trabalho, um aumento significativo na produção de ramnolipídeos foi alcançado substituindo o óleo de girassol (2,98 g/L de ramnolipídeos) e o glicerol (1,77 g/L de

ramnolipídeos) por óleo de soja (4,31 g/L de ramnolipídeos), sugerindo a possibilidade do uso do óleo de soja, uma fonte de carbono renovável e de relativo baixo custo para a produção de ramnolipídeos (RAHMAN *et al.*, 2002). Mas também há relatos de fermentações utilizando uma relação de C/N de apenas 20/1, composta por glucose, glicerol e óleo vegetal comercial, que também apontaram para uma maior produção de ramnolipídeos a partir dos óleos vegetais (SANTA ANNA *et al.*, 2002).

Tabela 5. Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em Fermentação Submersa

Cepa	Fonte carbono	Ramnolipídeos	Referências
<i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 614	Glicerol	3,9 g/L	(MONTEIRO <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. aeruginosa</i> DSM	Glucose	2,25 g/L	(REILING <i>et al.</i> , 1986)
<i>P. aeruginosa</i> ^a	Glicerol	3,16 g/L	(SANTA ANNA <i>et al.</i> , 2002)
<i>P. aeruginosa</i> LBI	óleo de nozes	9,90 g/L	(COSTA <i>et al.</i> , 2006)
<i>P. aeruginosa</i> LBI	<i>soapstock</i> ^c	12,0 g/L	(BENINCASA <i>et al.</i> , 2002)
<i>P. aeruginosa</i> LBI	<i>Soapstock</i>	11,7 g/L	(NITSCHKE <i>et al.</i> , 2005b)
<i>P. aeruginosa</i> ^b	óleo de peixe	22,7 g/L	(LEE <i>et al.</i> , 2004)
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3924	Etanol	32,0 g/L	(MATSUFUJI <i>et al.</i> , 1997)
<i>P. aeruginosa</i> UI 29791	óleo de milho	46,0 g/L	(LINHARDT <i>et al.</i> , 1987)
<i>P. aeruginosa</i> DSM7108	óleo de soja	78,0 g/L	(LANG & WULLBRANDT, 1999)
<i>P. aeruginosa</i> DSM7107	óleo de soja	112,0 g/L	(LANG & WULLBRANDT, 1999)

^a *P. aeruginosa* isolada de água de lavagem de poços de petróleo do Nordeste do Brasil.

^b *P. aeruginosa* isolada de água do mar da Coréia.

^c subproduto obtido a partir do resíduo do refino do óleo de soja bruto.

A quantidade de ramnolipídeos produzida por fermentação submersa varia conforme o tipo e a escala de processo, o meio e as condições de cultivo utilizadas. A produção de ramnolipídeos em escala-piloto foi estudada por fermentação contínua,

utilizando glucose como fonte de carbono, e a máxima concentração de ramnolipídeo obtida foi de 2,25 g/L (REILING *et al.*, 1986), o que não é um resultado de produção tão significativo, uma vez que resultados bem mais expressivos já foram obtidos: 12 g/L utilizando soapstock (BENINCASA *et al.*, 2002); 22,7 g/L utilizando óleo de peixe (LEE *et al.*, 2004); 32 g/L utilizando etanol (MATSUFUJI *et al.*, 1997); 46 g/L utilizando óleo de milho (LINHARDT *et al.*, 1987); entre outros. Os triacilgliceróis parecem ser os melhores indutores para a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa*. Resultados muito altos foram obtidos com óleo de soja, 78 g/L (WULLBRANDT *et al.*, 1994, 1995 *apud* LANG & WULLBRANDT, 1999) e 112 g/L (WULLBRANDT *et al.*, 1998 *apud* LANG & WULLBRANDT, 1999). Dado que os estudos de produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* foram todos realizados em FS, e que esta tecnologia apresenta algumas limitações como a formação de espumas (discutida na próxima seção) e que a fermentação em estado sólido (FES) pode apresentar muitas vantagens para a produção de muitos metabólitos de interesse industrial, incluindo ramnolipídeos, a próxima seção abordará a tecnologia de FES como uma alternativa para a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa*.

2.3. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Fermentação em estado sólido (FES) é definida como a fermentação envolvendo sólidos na ausência ou quase ausência de água livre nos espaços entre as partículas do sólido. Entretanto, as partículas do substrato em si devem conter umidade suficiente para permitir o crescimento e o metabolismo do microrganismo. O ambiente fornecido ao microrganismo neste sistema é bem diferente daquele fornecido pela fermentação submersa. A disponibilidade restrita de água pode estimular a produção de alguns metabólitos específicos, que não seriam produzidos na fermentação submersa, além de

possibilitar uma maior produtividade volumétrica e um maior rendimento. Outras vantagens associadas à FES são a possibilidade de obtenção de extratos mais concentrados, facilitando o processo de purificação do metabólito de interesse, além da possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como substratos de fermentação, diminuindo os custos do processo ((MITCHELL *et al.*, 2006, 2003; SATO & SHIGETOSHI, 1999; MOO-YOUNG *et al.*, 1983).

Os substratos tipicamente utilizados na FES são de origem agroindustrial, subprodutos, produtos processados ou produtos agrícolas propriamente ditos. Grãos de arroz, raízes de mandioca, soja, farelo de arroz, farelo de trigo, fubá, casca de arroz, casca de trigo, entre outros, podem ser utilizados com substratos (MITCHELL *et al.*, 2002). Destacam-se as aplicações que utilizam resíduos sólidos agroindustriais que apresentam um baixo custo e são potencialmente poluidores (PANDEY, 2003).

A Tabela 6 apresenta alguns exemplos de substratos e de aplicações da FES. A FES tem sido utilizada para a produção de metabólitos secundários biologicamente ativos (toxinas, antibióticos), enzimas, cogumelos, ácidos orgânicos, aminoácidos, na alimentação (laticínios, aromas), vitaminas, etanol, biopesticidas (HÖLKER & LENZ, 2005; PANDEY *et al.*, 1999). Alguns autores verificaram que na FES a produção de substâncias de interesse na indústria alimentar como aromas, corantes e enzimas, apresenta maiores rendimentos ou as características dos produtos são melhores do que na FS (PANDEY *et al.*, 1999).

Tabela 6. Exemplos de substratos e das aplicações da fermentação no estado sólido (FES)

Substratos/ Suportes	Aplicações
Lignocelulósico	
<u>Palha de trigo</u>	Enriquecimento protéico Degradação de lignina para ruminantes Rações Cultivo de cogumelos
<u>Farelo de trigo</u>	Produção de enzimas Produção de hormônios de crescimento de plantas Produção de drogas imunossupressivas (Ciclosporina A) Produção de aromas
<u>Bagaço de cana-de-açúcar</u>	Enriquecimento protéico Produção de antibióticos (Penicilina) Produção de ácido láctico
<u>Torta de girassol</u>	Produção de antibióticos (Cefamicina C)
<u>Açúcar da polpa da beterraba</u>	Enriquecimento protéico para rações
<u>Polpa do café</u>	Produção de pectinase
<u>Farelo amiláceo de arroz</u>	Produção de aromas Produção de proteases Produção de pigmentos
<u>Bagaço de mandioca</u>	Produção de aromas
<u>Sementes de soja</u>	Produção de alimentos fermentados
Sintéticos	
<u>Espuma de poliuretano</u>	Produção de enzimas
<u>Resina polimérica</u>	Produção de lipases
Frutas	
<u>Resíduos de maçã</u>	Produção de etanol e goma xantana
<u>Casca do kiwi</u>	Produção de ácido cítrico
<u>Semente de amaranto</u>	Produção de compostos voláteis

(Fonte: COUTO & SANROMAN, 2006.)

O Brasil é um país fundamentalmente de base agrícola e florestal, apresenta uma vasta dimensão territorial e características climáticas que lhe conferem uma posição

privilegiada em termos de biodiversidade e em termos de capacidade de produzir recursos renováveis em grande escala. A estimativa do IBGE para a produção nacional, em 2007, de cereais, leguminosas e oleaginosas (caroço de algodão, amendoim, arroz, feijão, mamona, milho, soja, aveia, centeio, cevada, girassol, sorgo e trigo) é de aproximadamente 122 milhões de toneladas. As atividades agroindustriais e florestais no Brasil geram uma grande variedade e quantidade de resíduos sólidos que podem, potencialmente, ser aproveitados em processos de FES. A produção de arroz neste ano será de cerca de 10,6 milhões de toneladas, gerando entre 1,8 e 2,4 milhões de toneladas de casca de arroz. Segundo a CONAB (2006) (Companhia Nacional de Abastecimento), a produção de cana-de-açúcar na safra 2006/2007 será de 475,6 milhões de toneladas, gerando mais de 142 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar, dos quais aproximadamente 95% serão queimados nas caldeiras das próprias usinas, enquanto os 5% (mais de 7,1 milhões de toneladas) restantes sobrarão. Outros possíveis substratos para a FES incluem o bagaço de mandioca, gerados pela indústria de processamento de amido, que possui entre 40 a 60% de amido residual, as tortas resultantes da extração de óleos de soja, milho e girassol e o pó de serra, gerado pela indústria madeireira.

Considerando que uma quantidade admirável de resíduos que podem servir como substratos para a produção de vários compostos de interesse industrial, a produção de ramnolipídeos por FES apresenta duas justificativas muito fortes: por um lado, (a) a utilização de resíduos sólidos abundantes no Brasil, o que pode reduzir o custo de produção e colaborar para solucionar problemas ambientais relacionados com esses resíduos, além da possibilidade de agregar valor a esses subprodutos do setor agroindustrial e por outro, (b) a FES evita a formação de espuma, fator limitante da obtenção desses compostos por FS. Entretanto, para se viabilizar a utilização de resíduos sólidos por FES e conseqüentemente a produção de ramnolipídeos de *P. aeruginosa*, faz-se necessário o desenvolvimento e implementação de tecnologias de biorreatores de FES para produção em larga escala.

2.2.3. Fermentação em Estado Sólido, uma alternativa para a produção de ramnolipídeos

Comercialmente, o processo de produção de biosurfactantes ainda não alcançou um grande reconhecimento (BOGNOLO, 1999), sendo ainda restrita a produção industrial desses tensoativos.

Uma das maneiras de reduzir-se os custos de produção é pela utilização de resíduos agroindustriais. Vários autores estudaram a produção de biosurfactantes utilizando este tipo de resíduo, utilizando usualmente os processos de fermentação submersa (FS). Por exemplo, DAS & MUKHERJEE *et al.*, (2007) utilizaram em FS uma mistura de 2% (m/v) de casca de batata como substrato com a cepa de *B. subtilis* (DM-03 e DM-04) para a produção de lipopeptídeos. O biosurfactante produzido foi capaz de reduzir a TS para as duas linhagens de 68 mN/m para 34 mN/m e com uma produção de 80 mg/g.S.S (miligramas por grama de substrato seco) após 48h de cultivo para a cepa de *B. subtilis* DM-03 e uma produção de 23 mg/g.S.S para a cepa de *B. subtilis* DM-04. MAKKAR & CAMEOTRA (1997) utilizaram o melaço de cana como substrato para as linhagens de *B. subtilis* (MTCC 2423 e MTCC 1427) para produção de biosurfactante. O biosurfactante produzido foi capaz de abaixar a tensão superficial do meio respectivamente, para 29 e 31 mN/m para as duas espécies. FOX & BALA (2000) utilizaram resíduos de batata como substrato para a linhagem de *B. subtilis* ATCC 21332, produzindo um biosurfactante que reduziu a tensão superficial do meio para 30 mN/m com uma CMC de 150 mg/L. Neste trabalho não houve quantificação do biosurfactante produzido.

Apenas dois trabalhos reportam a utilização de processos FES para a produção de biosurfactantes, todos utilizando cepas do gênero *Bacillus*, sendo que não há relatos na literatura sobre a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* por esta tecnologia. DAS & MUKHERJEE *et al.*, (2007) estudaram a produção de biosurfactantes por *Bacillus subtilis*

(DM-03 e DM-04) por FES utilizando casca de batata como substrato em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 5 g de substrato. Neste estudo obtiveram uma redução de TS de 72 mN/m para 40 mN/m com a cepa *B. subtilis* DM-03 e 72 mN/m para 33 mN/m com a cepa *B. subtilis* DM-04, com uma produção de 67 mg/g.S.S para a cepa *B. subtilis* DM-03 e de 20 mg/g.S.S para a cepa de *B. subtilis* DM-04. OHNO *et al.*, (1995) utilizaram como substrato o resíduo fermentado de soja “okara” (de consistência pastosa) para as linhagens *B. subtilis* (MI 113 com um plasmídeo recombinante pC112), o qual produziu o potente biosurfactante – a Surfactina - na quantidade de 2,0 mg/g.S.S, que foi oito vezes mais alta do que com experimentos anteriores utilizando a cepa original de *B. subtilis* RB14.

A FES é uma tecnologia simples, eficientemente utilizada para a produção de muitos compostos de grande interesse, utilizando substratos de baixo custo (VEENANADIG *et al.*, 2000). Esta tecnologia seria de interesse para a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* por duas razões: (1) a FES possibilita a utilização de resíduos sólidos como substratos de baixo custo, podendo dessa forma reduzir o custo e viabilizar a produção desse importante tensioativo; (2) o uso da FES evita a formação de espuma, fator limitante da obtenção desses compostos por FS, pois junto com a espuma há saída e conseqüente perda de nutrientes, produtos e biomassa, o que reduz a produtividade, ou em casos extremos inviabiliza a fermentação (YEH *et al.*, 2006; LEE & KIM, 2004).

Por outro lado, a utilização da tecnologia de FES para a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* é acompanhada por muitos desafios, já que não existem artigos na literatura para a produção desses ramnolipídeos por FES, tanto para se suprir as condições mínimas necessárias para que a bactéria se desenvolva e produza o tensioativo em concentrações viáveis, como do ponto de vista do processo em larga escala, construção e a operação de biorreatores de FES.

2.4. CONTAMINAÇÃO, TOXICIDADE E TRATAMENTO DE SÍTIOS CONTAMINADOS POR PETRÓLEO

2.4.1. Contaminação por petróleo

O petróleo, com sua complexa constituição e conseqüente variedade de características físicas e químicas, é reconhecido como um dos principais causadores da poluição ambiental. Na maioria das vezes, a contaminação resulta em enormes e imediatos danos na fauna marinha (mamíferos marinhos, aves marinhas, peixes e mariscos), com conseqüências em longo prazo, provocando mudanças em sistemas ecológicos e ambientes vitais em zonas costeiras, assim como às pessoas que vivem nos locais afetados (TEAS *et al.*, 2001).

Vários dos componentes do petróleo interagem com a biota, criando possíveis efeitos adversos em diferentes níveis de organismos biológicos. Em áreas costeiras, certos organismos constituem importantes linhas de transporte de contaminantes, incluindo peixes e moluscos (PESO-AGUIAR *et al.*, 2000). Peixes e gorduras de peixes contêm Omega-3 (ácidos graxos poliinsaturados), que têm grande importância para a saúde humana. Entretanto, quando ocorre a liberação de compostos orgânicos em águas, estas espécies podem se acumular em tecidos (bioacumulação e biomagnificação) aumentando os níveis destes contaminantes (SIDHU, 2003).

As atividades relacionadas com a produção, transporte e estocagem de petróleo são inevitáveis (pelo menos por enquanto) e envolvem riscos de acidentes com derramamentos. Vazamentos marítimos são freqüentes e aparecem como principal fonte da contaminação de águas marítimas. Em março de 1989, o petroleiro Exxon Valdez derramou aproximadamente 54 milhões de litros de óleo cru na região costeira do sul do Alaska, causando severa destruição no meio ambiente. A destruição de tanques de estocagem no

Kuwait durante a guerra do Golfo em 1991 liberou milhões de galões de óleo no mar. Acidentes recentes com tanques de óleo, como por exemplo, no mar do Japão e no estreito de Malaca, causaram séria poluição no mar e ao redor da costa, bem como efeitos desastrosos na fauna marinha. Além disso, mais de 300 acidentes foram descritos durante os últimos 10 anos (TEAS *et al.*, 2001).

O derramamento de óleo no Brasil tem aumentado significativamente nos últimos anos. Em novembro de 2001, por exemplo, a ruptura de um oleoduto provocou o vazamento de 100 mil L de óleo cru dentro da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro. Apesar dos esforços para contenção da contaminação, a mancha de óleo estendeu-se até Niterói. Outro evento desta magnitude ocorreu em 16 de fevereiro de 2001, quando a ruptura de um oleoduto provocou o lançamento de 50 mil L de óleo diesel no Atlântico perto da cidade de Curitiba. Apesar do trabalho de mais de 200 pessoas para conter o óleo, a mancha avançou por 10 quilômetros, contaminando a reserva natural da Mata Atlântica e cinco rios da região. O pior derramamento de óleo ocorrido no Brasil nos últimos 25 anos aconteceu em 16 de junho de 2000, quando outro oleoduto rompeu na Refinaria Getúlio Vargas no Estado do Paraná e 4 milhões de litros de óleo cru vazaram. Mesmo após grandes esforços, mais de 3,5 milhões de litros de óleo chegaram ao Rio Barigüi e alcançaram o Rio Iguaçu (ARARUMA *et al.*, 2004).

2.4.2. Contaminação por derivados de petróleo

O transporte e a distribuição de combustíveis derivados de petróleo (óleo diesel, gasolina e outros) representam atividades de elevado risco ambiental, principalmente em função da possibilidade de acidentes durante o transporte e de vazamentos devidos à estocagem inadequada (HALMEMEIS *et al.*, 2003). Em eventos como estes, compostos orgânicos de baixa solubilidade em água vão se dissolvendo gradualmente formando

plumas de águas poluídas na direção do fluxo da água, contaminando todo o volume do aquífero.

Para se ter uma idéia do problema, a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (EPA) estima que existam mais de 1,5 milhões de tanques subterrâneos de armazenamento de gasolina nos Estados Unidos. Destes, 400.000 já foram substituídos ou adaptados de acordo com as legislações federais. Mesmo assim, mais de 250.000 casos de vazamentos já foram identificados e mais de 97.000 ações remediadoras foram implantadas. Semanalmente, mais de 1.000 novos casos de vazamentos estão sendo encontrados em todo território americano (TIBURTIUS *et al.*, 2005).

Os solos são matrizes extremamente complexas que variam muito em suas características, sendo o destino do poluente no solo bastante dependente de vários fatores, tais como pH do solo, o tipo do contaminante e afinidade pela fase sólida ou aquosa (HIGARASHI, 1999). Os principais destinos dos poluentes no meio ambiente são o transporte por volatilização, a retenção, causada pela interação com o solo, a percolação, transformação biótica (biodegradação) e abiótica (degradação físico-química), dentre outros. As interações entre solo e contaminante acontecem, em geral, por várias forças relativamente fracas tais como dipolo-dipolo, dipolo/dipolo induzido e ligação de hidrogênio (LUCHESE *et al.*, 2001).

O maior problema da contaminação de solos e águas com gasolina está relacionado a dois grupos predominantes de hidrocarbonetos: os hidrocarbonetos aromáticos (por exemplo: benzeno, tolueno e xilenos - BTX) e hidrocarbonetos alifáticos (C₅-C₁₂). Os compostos aromáticos (BTX e outros alquilbenzenos) perfazem cerca de 10-59% da gasolina (m/m), enquanto os hidrocarbonetos alifáticos correspondem a 41-62% (m/m) Os hidrocarbonetos aromáticos são geralmente mais tóxicos que os compostos alifáticos com o mesmo número de átomos de carbono e possuem maior mobilidade em água, sendo a sua solubilidade em água da ordem de três a cinco vezes maior (WATTS *et al.*, 2000).

Os hidrocarbonetos aromáticos polinucleares (PAHs) constituem uma importante fração dos hidrocarbonetos de petróleo, sendo considerados os maiores contaminantes de solos e águas, em razão de serem reconhecidamente citotóxicos, mutagênicos e potencialmente carcinogênicos. O efeito carcinogênico do benzeno está relacionado ao fato dele ser um agente leucemogênico para o ser humano, principalmente quando associado à exposição industrial (CALVO *et al.*, 2004; BONO *et al.*, 2001, STRAUBE *et al.*, 1999).

No Brasil, existem mais de 32.697 postos de gasolina, segundo a Agência Nacional do Petróleo, ANP, os quais podem provocar um impacto sobre recursos aquáticos, principalmente envolvendo águas subterrâneas. Ainda não existem estatísticas sobre a magnitude do problema da contaminação por gasolina. Entretanto, em função de muitos tanques terem mais de 25 anos de uso, acredita-se que a possibilidade de ocorrer vazamentos é extremamente grande, principalmente pelo surgimento de rachaduras ou corrosão (TIBURTIUS *et al.*, 2005).

MANZOCHI (2001) acompanhou atividades operacionais de abastecimento e descarga de combustíveis, troca de óleo e lavagem de veículos em um posto de abastecimento de combustíveis de Florianópolis (SC). Ele alerta que, carregado pela chuva, o material derramado pode contaminar o solo e a água, atingindo rios, lençóis freáticos e galerias de águas pluviais. Considerando o vazamento de 10 mL por dia, durante um ano, haverá comprometimento de 3 milhões de litros de água. A extensão da contaminação depende do vazamento e das condições do local onde o posto está instalado, como o tipo de solo da região e as características do material e por onde escoar a água subterrânea.

Experiências têm demonstrado que diferentes formulações na gasolina podem afetar o destino e transporte do BTX. O uso do etanol como ingrediente na formulação da gasolina tem aumentado mundialmente com intuito de minimizar a poluição atmosférica oriunda da combustão. Atualmente no Brasil, por exemplo, a gasolina é aditivada com 20-25% de etanol, fator que aumenta consideravelmente a probabilidade de contaminação de

águas subterrâneas por BTX, pois o etanol é completamente miscível em água o que faz com que, por efeito de co-solvente, aumente a solubilização e migração do BTX (CORSEUIL *et al.*, 1998).

Em função dos antecedentes antes comentados, a legislação tem se tornado cada vez mais restritiva (BILSTAD & ESPEDAL, 1996). A Agência de Proteção Ambiental Norte Americana, por exemplo, estabelece o limite máximo para a concentração do benzeno em 5 µg/L em água potável. No Brasil, a portaria nº 1469/2000 do Ministério da Saúde determina que os limites máximos permitidos para benzeno, tolueno e xilenos são de 5 µg/L, 170 µg/L e 300 µg/L, respectivamente, para que a água seja considerada potável. Entretanto, a concentração do benzeno dissolvido em água contaminada por gasolina pode chegar até 3×10^4 µg/L (SILVA *et al.*, 2002).

2.4.3. Tratamento de Sítios Contaminados

Águas e solos contaminados são encontrados com maior frequência nas redondezas de locais de descarte de lixo, plantas químicas, oleodutos e postos de gasolina. A remediação de águas e solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo é normalmente um processo bastante difícil e demorado, pois sua eficiência é intrinsecamente dependente das interações do contaminante com o meio ambiente (HIGARASHI, 1999). Dependendo das avaliações de risco, geralmente baseadas na saúde humana e no critério de uso e ocupação do solo, pode-se optar por técnicas de remediação no local “*in situ*” ou fora do local da contaminação “*ex situ*”. Portanto, a escolha do melhor processo é condicionada a algumas variáveis tais como, as características do sítio contaminado, da legislação vigente, custos e restrições com o tempo requerido para a remediação (KHAN *et al.*, 2004).

A utilização indiscriminada, tanto de surfactantes como de biosurfactantes, pode levar ao lixiviamento de contaminantes para os lençóis freáticos e mananciais, acentuando o

problema de contaminação e colocando em risco populações, fauna e flora próximas dos locais contaminados. Portanto, a utilização de agentes tensioativos em processos de lavagem de solos deve ser avaliada com cautela, e normalmente deve ser associada com uma etapa de recuperação dos contaminantes para posterior tratamento, a não ser em técnicas *in situ*, nos casos em que o próprio microrganismo produtor do biosurfactante encarrega-se de fazer a degradação do poluente (KHAN *et al.*, 2004).

2.4.4. Processos Físicos e Químicos

Processos físico-químicos têm sido largamente empregados na remediação de águas e de solos contaminados, normalmente mostrando compatibilidade com os critérios ambientais estabelecidos pelas legislações vigentes. Dentre os mais importantes, destacam-se os processos apresentados na Tabela 7, onde suas principais características são também apresentadas.

No caso de águas contaminadas, a tecnologia de tratamento mais utilizada corresponde ao sistema “*pump-and-treat*”, que consiste na remoção da água contaminada por bombeamento, seguida de tratamento “*ex situ*” por processos convencionais, geralmente adsorção em carvão ativado (MACKAY *et al.*, 2000; SHIANETZ, 1999). Apesar destes processos serem eficientes, eles apresentam sérias limitações, principalmente relacionadas com o seu caráter não destrutivo. Ou seja, esta técnica simplesmente leva à geração de fases sólidas saturadas com poluentes não destruídos. Adicionalmente, a necessidade de associar diversas tecnologias de tratamento faz com que os processos se tornem demorados e dispendiosos, principalmente pela complexidade das instalações.

Tabela 7. Tecnologias de tratamento de compostos orgânicos por processos físico-químicos, térmicos e de disposição

Tecnologia	Aplicação	Categoria	Processo
<i>Pump-and-treat</i>	<i>ex situm</i>	tratamento	físico-químico
<i>Air stripping</i>	<i>in situ</i>	tratamento	físico
Lavagem do solo	<i>in situ</i> <i>ex situm</i>	tratamento	físico
Extração por vapor	<i>in situ</i>	tratamento	físico
Incineração	<i>ex situm</i>	tratamento	térmico
Estabilização Solidificação	<i>in situ</i> <i>ex situm</i>	tratamento	físico-químico
Aterro de cobertura	<i>ex situm</i>	contenção	disposição
Oxidação catalítica	<i>ex situm</i>	tratamento	térmico
Barreiras reativas	<i>in situ</i>	tratamento	físico-químico

A lavagem do solo como sistema de recuperação do solo contaminado normalmente inclui o uso de surfactantes, a extração de vapor do solo e a dessorção térmica. Recentemente, foi reportado que o uso de surfactantes pode acelerar o procedimento de remediação de solos, aumentando a eficiência do processo de lavagem. Trata-se de um sistema atrativo sob o ponto de vista ambiental, principalmente quando comparado ao uso de solventes orgânicos (URUM & PEKDEMIR, 2004; MULLIGAN *et al.*, 2001; DESHPANDE *et al.*, 1999). O uso de tensoativos permite a redução da tensão superficial entre o contaminante e a água, aumentando a mobilidade dos contaminantes em processos de “*soil flushing*” (*in situ*) ou “*soil washing*” (*ex situm*) (BORDAS *et al.*, 2005).

URUM *et al.* (2005) estudaram a remoção de petróleo de um sítio contaminado usando sistema de lavagem do solo associado à flotação, similar aos processos usados em áreas de mineração. Neste estudo, dois tipos de surfactantes glicolípídeos e lipopeptídeos foram usados, além da avaliação dos modos de lavagem, agitação e “*air sparging*”. Os resultados

demonstraram que o melhor resultado foi obtido com o surfactante dodecilsulfato de sódio, atingindo índices de remoção do óleo maiores que 80%. Contudo, apesar do excelente resultado obtido, os autores salientam que ainda há necessidade de estudos posteriores em escala piloto e de campo para assegurar a eficiência do processo de remoção.

2.4.5. Utilização de biosurfactantes

Recentemente, uma alternativa para limpeza de solos contaminados com óleo cru ou petróleo tem sido o uso de biosurfactantes. O uso de biosurfactantes em aplicações ambientais é bastante promissor devido à sua biodegradabilidade, tanto em água como em solos, e por serem menos tóxicos que os tensoativos químicos (MULLIGAN, 2005, MESQUITA, 2004). Efetivamente, a sua aplicação aumenta o processo de biodegradação, uma vez que a solubilização de compostos de baixa solubilidade aumenta a biodisponibilidade destes compostos para microrganismos. Além disso, muitos destes processos, quando associados com tecnologias como a lavagem do solo, viabilizam o processo pelo baixo custo. Resultados ainda melhores podem ser conseguidos pela associação de processos de separação física com tratamentos químicos orientados à degradação dos poluentes (MANN, 1999). Infelizmente, o emprego de biosurfactantes tem sido limitado pelos altos custos de produção. Por outro lado, o desenvolvimento de novas tecnologias de produção poderá tornar seu uso bastante comum, devido a sua versatilidade, biodegradabilidade e toxicidade reduzida (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

A Tabela 8 apresenta as diversas possibilidades de aplicações dos biosurfactantes.

Tabela 8. Biosurfactantes e ramos industriais de aplicações

Ramo industrial	Aplicação	Função do Biosurfactante
PETRÓLEO	Recuperação melhorada de petróleo (MEOR)	Redução da viscosidade de óleos, recuperação de óleo residual
	Desemulsificante	Desemulsificação de emulsões, solubilização, redução da viscosidade, agente umectante
AMBIENTAL	Biorremediação	Emulsificação de hidrocarbonetos, agente sequestrante de metais
	Remediação <i>Soil washing,</i> <i>Soil flushing</i>	Emulsificação pela aderência ao hidrocarboneto, dispersante, agente de espuma, detergente

Fonte: ADAPTADA SINGH *et al.*, (2007).

Em relação às aplicações industriais, uma que se destaca é a recuperação melhorada do petróleo (microbial enhanced oil recovery - MEOR). A MEOR consiste em uma tecnologia que utiliza microrganismos ou produtos de seu metabolismo para a recuperação de óleo residual. Os microrganismos produzem biosurfactantes que reduzem a tensão superficial óleo-rocha, diminuindo as forças capilares que impedem a movimentação do óleo através dos poros da rocha, possibilitando um aumento da recuperação do óleo. No mesmo processo, os biosurfactantes também auxiliam na emulsificação e na quebra dos filmes de óleo das rochas (SINGH *et al.*, 2007).

A aplicação de biosurfactantes em processos MEOR envolve duas técnicas: a) *in situ*, onde microrganismos produtores de biosurfactantes são introduzidos no reservatório, com a adição de nutrientes adequados ao seu crescimento, e b) *extra situm*, onde o biosurfactante é produzido na superfície, isolado, purificado e injetado no reservatório. Das duas técnicas, a que apresenta menos problemas de aplicação, embora seja mais cara, é a

extra situ, uma vez que na técnica *in situ* o ambiente de crescimento do microrganismo é considerado microbiologicamente agressivo, ou seja, altas pressões e temperaturas, valores de pH extremos, força iônica elevada e competição com microrganismos endógenos, requerimento e disponibilidade de substratos e condições anaeróbicas (BANAT *et al.*, 2000).

Um exemplo da eficiência de diferentes biosurfactantes utilizados em MEOR, em testes de laboratório, onde se avaliou a remoção de óleo, está apresentado na Tabela 9. Verificou-se a maior remoção de óleo (cerca de 18% maior) para o processo com biosurfactantes em um menor tempo de ação dos compostos em relação ao controle (média de 38 h a menos), onde foi adicionada apenas água.

Tabela 9. Efeito da adição de biosurfactantes na recuperação de óleo (MEOR) em escala laboratorial

Biosurfactante	Tempo (horas)	Remoção de óleo (%)
Controle (água)	114	81
Soforolipídeo	75	97
Ramnolipídeo	77	94
Trealose 6-6' dimicolato	71	93
Celobiose	79	99

Fonte: MULLER-HURTING *et al.*, (1993).

Os ramnolipídeos também podem ser utilizados no processo de biorremediação. A biorremediação caracteriza-se como uma tecnologia limpa e de baixo custo, que permite a recuperação de locais contaminados pela estimulação do crescimento de microrganismos nativos, que possuem capacidade de degradar o óleo, convertendo substâncias complexas em moléculas mais simples ou voláteis, promovendo a degradação dos contaminantes adsorvidos ao solo (CAMMAROTA & FREIRE, 2006). A bioremediação muitas vezes

aparece como uma ferramenta viável na restauração ambiental da superfície contaminada, principalmente quando a área contaminada possui grande extensão e volume, o que inviabiliza a escavação e outras tecnologias, permitindo a remediação no próprio local (FANG & BARCELONA, 2003).

Na biodegradação de contaminantes orgânicos, o efeito da adição de ramnolipídeos tem sido vastamente estudado. SHREVE *et al.*, ZHANG & MILLER, citados por MULLIGAN, (2005) relataram que a concentração em meio aquoso de 300 mg/L de ramnolipídeos aumentou a degradação do octadecano para 20%, produzindo CO₂ e água (mineralização) comparada a 5% do controle sem ramnolipídeos. MAIER & SOBERÓN-CHÁVEZ (2000) relataram que a adição de ramnolipídeos no meio aquoso melhora a biodegradação dos compostos hexadecano, octadecano, *n*-parafina e fenantreno, e em solos, dos compostos hexadecano, tetradecano, pristina, creosato e outras misturas de hidrocarbonetos.

RAHMAN *et al.*, (2003) relataram a biorremediação de *n*-alcanos em um lodo de petróleo contendo 87,4% de óleo e graxas. Dez por cento (10%) deste lodo continham alcanos de cadeia C₈-C₁₁ e que foram degradados 100%; enquanto os alcanos de cadeia C₁₂-C₂₁, C₂₂-C₃₁, e C₃₂-C₄₀ foram degradados respectivamente, 83-98%, 80-85% e 57-73% depois de 56 dias com a adição de um consórcio de bactérias, nutrientes e ramnolipídeos.

Na biodegradação envolvendo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) VIPULANANDAN e REN citados por MULLIGAN, (2005), compararam a solubilização do naftaleno por um biosurfactante (ramnolipídeo), um surfactante aniônico, (dodecil sulfato de sódio, SDS), e por um surfactante iônico - Triton X-100. Neste trabalho, o biosurfactante aumentou a solubilidade do naftaleno em 30 vezes. Entretanto, a biodegradação do naftaleno (30 mg/L) levou 40 dias na presença do biosurfactante (10 g/L), comparado a 100 h para o Triton X-100 (10 g/L). O naftaleno na presença de SDS não foi biodegradado.

O uso de biosurfactantes na biodegradação de pesticidas também vem sendo objeto de investigação e sua eficácia depende do tipo de composto e das concentrações utilizadas. MATA-SANDOVAL *et al.*, (2001) relataram a biodegradação de três pesticidas em culturas líquidas e solos “soil slurries (pasta de solo)” por ramnolipídeos e por Triton X-100. A biodegradação do pesticida Trifluralin melhorou tanto na presença do biosurfactante quanto na do surfactante químico; entretanto, para o pesticida Atrazina, a biodegradação diminuiu para ambos. A biodegradação do pesticida Coumafós aumentou com a concentração de ramnolipídeos acima de 3 mmol/L, mas diminuiu quando a concentração de Triton X 100 estava acima da sua CMC. Em “soil slurries”, a degradação do Trifluralin diminuiu, tanto usando o biosurfactante quanto o surfactante químico, com o aumento das suas concentrações. Quando a concentração de ramnolipídeos aumentou, as taxas de degradação do Coumafós diminuíram, mas as de remoção aumentaram. A concentração de ramnolipídeo também diminuiu, sugerindo a biodegradação do próprio ramnolipídeo.

MULLIGAN e EFTEKHARI (2003) utilizaram a tecnologia *in situ soil flushing* na remediação de um solo contaminado com pentaclorofenol (PCF). Eles injetaram 1% de ramnolipídeo na forma de espuma em um solo contaminado com 1.000 mg/Kg de PCF e obtiveram a remoção de 60 - 61% de PCF. Um outro potencial de aplicação dos biosurfactantes é seu uso na agricultura, como agentes antimicrobianos. A ação antimicrobiana dos ramnolipídeos foi estudada por STANGHELLINI & MILLER (1997) em espécies de zoosporos fitopatogênicos, tais como *Pythium aphanidermatum* e *Phytophthora capsici*. Em concentrações de 5-30 µg/mL, os ramnolipídeos foram capazes de cessar o crescimento e lisar a população dessas espécies de zoosporos em apenas 1 min.

Além da biodegradação, os ramnolipídeos têm sido objeto de estudo nas tecnologias chamadas de “soil washing” e “soil flushing”. Na tecnologia *ex situ washing* os biosurfactantes tiveram um papel muito importante na limpeza do derramamento de óleo causado pelo navio Exxon Valdez, no Golfo do Alasca, em 1989. Outros exemplos

empregando esta tecnologia envolvem, além da remoção de óleo de locais contaminados, também a remoção de metais pesados. BANAT *et al.*, (2000), investigaram a aplicação de ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* ATCC 9027 na remoção de metais de solos contaminados com cádmio e níquel. Eles reportaram que 92% de Cd^{++} foram complexados em solução de 0,5 mmol/L de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, usando uma solução aquosa de ramnolipídeos (22 mg/L). NEILSON *et al.* (2003) relataram o potencial de aplicação de ramnolipídeos na remoção de metais de solos contaminados com chumbo. Os autores reportaram que, usando uma solução de 10 mmol/L de ramnolipídeos, cerca de 15% de chumbo foram removidos depois de 10 lavagens.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos o estudo da produção de biosurfactantes por fermentação em estado sólido (FES), a caracterização físico-química e o estudo de aplicações dos biosurfactantes em tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste projeto foram:

- Otimizar a produção de biosurfactantes por FES, verificando:
 - Efeito do tipo de substrato, utilizando resíduos agro-industriais como substratos, tais como tortas resultantes da extração de óleos, farelo de trigo, canola, soja, algodão, bagaço de cana-de-açúcar e estudar a variação dos sais nos meios de cultura.
 - Comparar a produção de biosurfactantes por FS e FES, para verificação da viabilidade da produção de biosurfactantes por FES;
 - Desenvolver o método de extração e purificação do biosurfactante produzido por FES;
 - Caracterizar o biosurfactante por técnicas físico-químicas, como concentração micelar crítica (CMC), índice de emulsificação ($E\%$) e tensão superficial;
 - Estudar a aplicação dos biosurfactantes na lavagem de solos contaminados, utilizando a gasolina como composto contaminante e analisar os resultados por técnicas de cromatografia gasosa em sistema headspace e por demanda química de oxigênio (DQO).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614, cepa originalmente isolada de uma planta petroquímica em Canto do Amaro, Rio Grande do Norte, gentilmente cedida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal do Pernambuco. Esta cepa mostrou excelente produção de ramnolipídeos (MONTEIRO *et al.*, 2007) foi mantida em meio líquido Luria Bertani (LB) com glicerol (40%, v/v) a -18°C.

4.2. PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

4.2.1. Preparo do pré-inóculo

O pré-inóculo foi realizado em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio Luria-Bertani (LB) (composição por L: 10 g NaCl, 10 g Triptona, 5 g extrato de levedura), inoculados com 1 mL da suspensão de células bacterianas e incubados a 30°C por 12 h sob agitação de 200 rpm. O crescimento bacteriano durante o preparo do pré-inóculo foi acompanhado pela determinação da absorbância do meio de cultivo a 600 nm (D.O._{600nm}).

4.2.2. Cultivos de fermentação em estado sólido

Os ensaios de FES foram realizados em frascos Erlenmeyers 250 mL, contendo 10 g de substrato seco. Os substratos (farelo de canola, soja, girassol, algodão e bagaço de

cana-de-açúcar) foram esterilizados por 15 min, a 121°C, resfriados e inoculados com o pré-inóculo (item 4.2.1) em uma proporção de 4% (v/v) de pré-inóculo (D.O._{600nm} entre 0,6 e 0,8). Conforme as condições do ensaio estabelecidas anteriormente (MONTEIRO *et al.*, 2007), a solução umedecedora foi constituída de meio de sais (contendo por litro: 3,0 g KH₂PO₄; 7,0 g K₂HPO₄; 0,2 g MgSO₄.7H₂O e 1,0 g (NH₄)₂SO₄), ou solução tampão (contendo por litro: 3,0 g KH₂PO₄; 7,0 g K₂HPO₄) ou água, acrescentada de glicerol (3% v/v). Os meios sólidos inoculados foram incubados em estufa bacteriológica a 30°C. Os experimentos foram realizados para o farelo de canola, soja, girassol, algodão com umidade de 55 – 70% e para o bagaço de cana-de-açúcar de 70 – 88%. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.3. Extração do biosurfactante

Os cultivos foram interrompidos, no tempo de fermentação oportuno, o sólido fermentado foi extraído com água destilada em agitador orbital a 200 rpm, por 1 h e em temperatura ambiente. Os extratos resultantes foram centrifugados a 12.500 g a 4°C por 10 min e os sobrenadantes obtidos foram utilizados para a determinação da tensão superficial (item 4.5.1) ou submetidos à extração com CHCl₃ e posterior quantificação indireta do biosurfactante por dosagem de ramnose, utilizando-se o método do fenol-sulfúrico (item 4.5.4).

4.2.4. Extração, purificação e caracterização dos ramnolipídeos produzidos por FES

As etapas de extração e purificação foram feitas com o objetivo de quantificar o biosurfactante produzido por FES e para análise de sua estrutura molecular. Para tanto, o sobrenadante obtido no item 4.2.3 foi submetido à extração com CHCl₃ e o extrato

orgânico foi recuperado em funil de separação e em seguida concentrado por evaporação em evaporador rotatório a 40°C. O extrato concentrado foi purificado por cromatografia em coluna (30 cm x 2 cm) com sílica gel 60 (0,063-0,200mm) (Merck), eluídas CHCl₃-MeOH (4:1 v/v) foram coletadas frações de 10 mL. A eluição das frações contendo o biosurfactante foi acompanhada por cromatografia em camada delgada, eluídas CHCl₃-MeOH (4:1 v/v).

4.3. PRODUÇÃO DO BIOSURFACTANTE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Os experimentos em FS foram realizados em paralelo com os experimentos em FES para que se tivesse um parâmetro de comparação de produção, já que não existem relatos na literatura da produção desses biosurfactantes por FES.

4.3.1. Curva de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* em frascos Erlenmeyers

Os experimentos da curva de crescimento foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 2000 mL (triplicata) contendo 400 mL de meio de sais e glicerol (contendo por litro: 3,0 g KH₂PO₄; 7,0 g K₂HPO₄; 0,2 g MgSO₄.7H₂O e 1,0 g (NH₄)₂SO₄ acrescentados de 3% (v/v) de glicerol). Os meios foram esterilizados por 15 min, a 121°C, resfriados e inoculados com o pré-inóculo (item 4.2.1) em uma proporção de 2% (v/v). Os frascos foram então incubados em agitador orbital com agitação de 200 rpm e temperatura de 30°C. O crescimento bacteriano foi acompanhado pela determinação da absorbância do meio de cultivo a 600 nm de alíquotas de 1,0 mL retiradas a cada 1 h. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.2. Curva de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* em biorreator de 5 L

O ensaio no biorreator foi realizado com o meio de sais e glicerol (item 4.3.1). O meio e a cúpula do reator foram esterilizados por 15 min, a 121°C, resfriados e inoculados com o pré-inóculo (item 4.2.1) em uma proporção de 2% (v/v). A fermentação foi conduzida a uma temperatura de 30°C sob agitação de 200 rpm e aeração de 3,0 L/min. O crescimento bacteriano foi acompanhado pela determinação da absorbância do meio de cultivo a 600 nm de alíquotas retiradas a cada 1 h.

4.3.3. Produção de ramnolipídeos por fermentação submersa

Os ensaios para FS foram realizados em frascos Erlenmeyers 250 mL, contendo 50 mL de meio de sais e glicerol (item 4.3.1). Os meios foram esterilizados por 15 min, a 121°C, resfriados e inoculados com o pré-inóculo (item 4.2.1) em uma proporção de 2% (v/v). Os cultivos foram interrompidos no tempo de fermentação oportuno, centrifugados a 12.500 g a 4°C por 10 min e o sobrenadante obtido foi utilizado para a determinação da tensão superficial (item 4.5.2) ou submetido à quantificação indireta dos ramnolipídeos pelo método de fenol-sulfúrico (item 4.5.4). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, seguindo o procedimento descrito por MONTEIRO *et al.*, (2007).

4.4. TRATAMENTO DO SOLO COM BIOSURFACTANTE

4.4.1. Descrição do solo

O solo utilizado foi cedido pela Embrapa Florestas Colombo-PR e correspondeu a um solo argiloso e arenoso da Região de Curitiba e Ponta Grossa. Os estudos descritos a seguir foram realizados com duas amostras identificadas como A e B. As principais características destes solos são apresentadas na Tabela 10, as quais foram avaliadas de

acordo com recomendações do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (1997). Com os dados fornecidos pela EMBRAPA, verifica-se que os dois solos são ácidos e com altas concentrações de Al^{3+} (LUCHESE *et al.*, 2001).

Tabela 10. Dados da composição das amostras de solos fornecidas pela EMBRAPA Florestas, Colombo PR

Parâmetro	Teor (solo A)	Teor (solo B)
pH (CaCl_2)	3,76	5,22
K^+	0,07 molL^{-1}	0,34 molL^{-1}
Ca^{2+}	0,30 molL^{-1}	6,78 molL^{-1}
Mg^{2+}	0,15 molL^{-1}	2,24 molL^{-1}
Al^{3+}	2,27 molL^{-1}	0,08 molL^{-1}
C	12,71 gKg^{-1}	28,47 gKg^{-1}
P	2,4 mgL^{-1}	21,3 mgL^{-1}
Na^+	9 mgL^{-1}	10 mgL^{-1}

4.4.2 Procedimento experimental:

Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyers 125 mL, contendo 20 g de solo (granulometria de 20 mesh), contaminado com 2% (v/m) de gasolina comercial do tipo comum e adicionados de 60 mL de extrato bruto livre de células contendo biosurfactantes produzidos por *P. aeruginosa* por FES usando o bagaço de cana como substrato, nas condições descritas no item 4.2.2., com concentração de ramnolípídeos de 2,2 g/L. Os frascos contendo o solo e o biosurfactante foram colocados em agitador orbital à temperatura ambiente, com agitação (150 rpm). Foram realizados controles com água nas mesmas condições para todos os ensaios. Os ensaios foram interrompidos após 24 h e 48 h e as amostras foram filtradas a vácuo. Em seguida, o sobrenadante foi submetido à análise de demanda química de oxigênio (DQO) em espectrofotômetro SHIMADZU VCPH TOC (TIBURTIUS *et al.*, 2005). Os hidrocarbonetos voláteis foram analisados por

cromatografia gasosa em sistema *headspace* em cromatógrafo Varian CP3800. Estas análises foram feitas no Laboratório Analítico Instrumental SENAI-SESI, Curitiba – PR.

4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.5.1. Determinação da tensão superficial

A medida da tensão superficial foi realizada nos sobrenadantes de cultura da FS ou nos extratos da FES livres de células, utilizando-se o tensiômetro *K12, Processor Tensiometer, Krüss*. As análises foram feitas pelo método do anel, utilizando um anel de platina denominado anel de Du Nouy. Neste método, a amostra é colocada em um recipiente do aparelho, com o anel inicialmente submerso. A força exercida sobre o anel no momento no qual a lâmina do líquido se rompe dá a medida da tensão superficial (Krüss, 1994). As condições de análise padronizadas para todos os ensaios foram: volume médio da amostra de 40 mL e temperatura ambiente. O equipamento foi calibrado sempre no início e término das análises medindo-se a tensão superficial da água destilada.

4.5.2. Determinação da concentração micelar crítica (CMC)

A CMC foi determinada a partir do extrato purificado de ranmolipídeos (após 7 dias de cultivo) em FES usando o bagaço de cana-de-açúcar como substrato. O extrato purificado foi diluído com igual volume de água destilada, segundo técnica descrita por SHEPPARD & MULLIGAN (1987). Após feitas tais diluições, mediu-se a tensão superficial de cada uma delas e construiu-se um gráfico da tensão superficial contra diferentes concentrações de açúcares totais, expressas em ramnose, onde a CMC corresponde ao ponto central de inflexão da curva. As medidas de tensão superficial foram

determinadas até que os valores obtidos se aproximassem da tensão superficial da água destilada.

4.5.3. Medida do índice de emulsificação (*E*)

O índice de emulsificação (*E* %) foi realizado segundo a metodologia descrita por COOPER & GOLDENBERG (1987). Foram distribuídos em tubos de ensaio 6 mL de diferentes hidrocarbonetos (querosene, tolueno, gasolina e diesel) adicionando-se 4 mL do sobrenadante de cultura filtrada livre de células. Cada tubo foi agitado em vórtex máximo por 2 min. O índice (*E* %) foi determinado de acordo com a equação 1. As medidas foram realizadas após 24 h.

$$E \% = \frac{\text{altura da camada emulsionada (cm)}}{\text{altura total do líquido (cm)}} \times 100 \quad (\text{eq. 1})$$

Onde *E* (%) = índice de emulsificação.

4.5.4. Dosagem de açúcares pelo método do fenol-sulfúrico

A quantificação indireta de ramnolipídeos foi realizada pela medida de açúcares totais pelo método de DUBOIS *et al.* (1956). A metodologia consistiu na adição de 0,5 mL do caldo livre de células em tubo de vidro de 20 mL, seguido da adição de 0,5 mL de solução de fenol 5% (m/v), mais 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi homogeneizada com o auxílio de um vórtex e deixada em repouso por 15 min. Após esse período, fez-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 480 nm. A medida foi lida contra a água destilada (branco reacional).

A curva de ramnose foi construída utilizando-se uma solução estoque de ramnose (Sigma-Aldrich) padrão com 0,936 mg/mL em água destilada. A partir desta solução foram

preparadas diluições correspondentes às concentrações (mg/L) de 15, 30, 45, 60 e 90 em balões volumétricos de 10 mL. A seguir, 1 mL de cada diluição foi adicionado em tubos e a dosagem de açúcares totais por ramnose foi realizada conforme descrita anteriormente. A Figura 4 mostra a curva padrão de ramnose (mg/L).

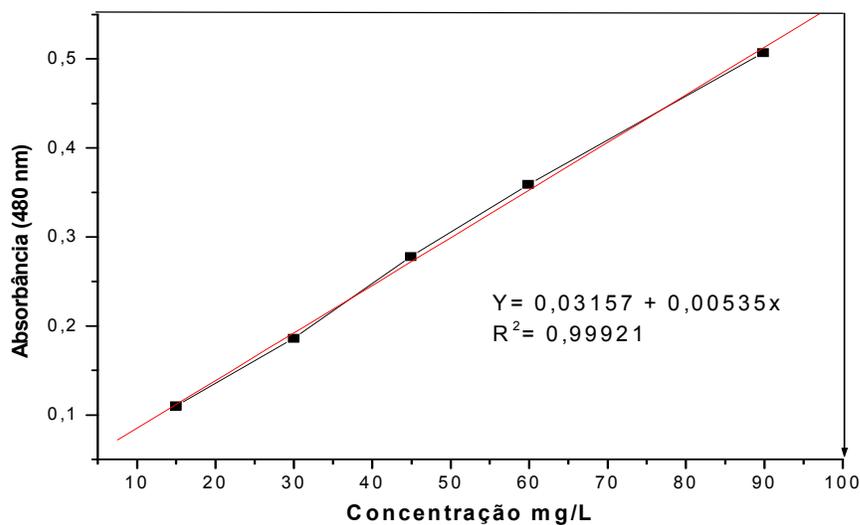


Figura 4. Curva padrão de açúcares totais por ramnose (mg/L) em função da absorbância a 480 nm, construída utilizando o método de DUBOIS *et al.*, (1956).

4.5.5. Medição de pH

Os valores de pH do sobrenadante da extração aquosa (item 4.2.3) foram medidos em potenciômetro 320 pH Meter, Cornig.

4.5.6. Cromatografia em camada delgada

A presença do biosurfactante nas frações eluídas da coluna de sílica gel foi verificada por cromatografia em camada delgada (CCD) realizadas em placas de sílica gel 60 com fluoresceína (Merck), utilizando como sistema de eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1). A

visualização das bandas foi feita com revelador específico para carboidratos, orcinol/H₂SO₄/MeOH (250:100:2,5), a 100°C por 5 min, utilizando ramnose como padrão.

4.5.7. Demanda química de oxigênio

O método de DQO, que se baseia nos parâmetros experimentais da calorimetria do crômio (III) do sistema dicromato/crômio(III), foi feito de acordo com ZUCCARI (1996), e com o seguinte procedimento analítico:

a) volume de solução de referência (300 mg.L⁻¹ a 3000 mg.L⁻¹ de DQO) ou de amostra: 2 mL.

b) volume de solução digestora (dicromato de sódio 0,40 mol.L⁻¹, sulfato de mercúrio 0,20 mol.L⁻¹, ácido sulfúrico 3,00 mol.L⁻¹): 1,5 mL.

c) volume de solução catalítica (sulfato de prata 0,02 mol.L⁻¹, ácido sulfúrico 15 mol.L⁻¹): 3 mL.

A mistura é colocada em digestor a 150°C por 2 h. Após esse período, a solução sofre resfriamento natural e sua absorbância é medida em espectrofotômetro SHIMADZU VCPH TOC a 600 nm, que é a região do espectro em que não há interferência do dicromato residual (ZUCCARI, 1996).

4.5.8. Cromatografia a gás em sistema *headspace*

Os hidrocarbonetos voláteis foram analisados por cromatografia a gás (sistema *headspace*) em cromatógrafo Varian CP3800, equipado com o detector de ionização de chama e uma coluna DB624, onde o solo é analisado sem lavagem em tubos contendo 5 g de solo. A curva analítica foi elaborada a partir de um padrão certificado, contendo a mistura de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) em metanol, na faixa de concentração compreendida entre 5 e 2000 µg.L⁻¹.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Curva de crescimento *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 em fermentação submersa em frascos Erlenmeyers e em biorreator

O objetivo desses experimentos foi verificar o crescimento, em FS, do microrganismo no mesmo meio utilizado na FES como solução para umedecer os substratos sólidos (pré-inóculo). Também visou-se verificar o crescimento da bactéria em biorreator, pois estes dados serão importantes no futuro, no momento de preparo de maior quantidade de pré-inóculo, quando de ensaios em biorreator de FES com capacidade de 100 kg de substrato.

A Figura 5 mostra uma comparação entre os perfis de crescimento de *P. aeruginosa* (leituras de D.O._{600nm}) obtidos por FS em Erlenmeyers e em biorreator.

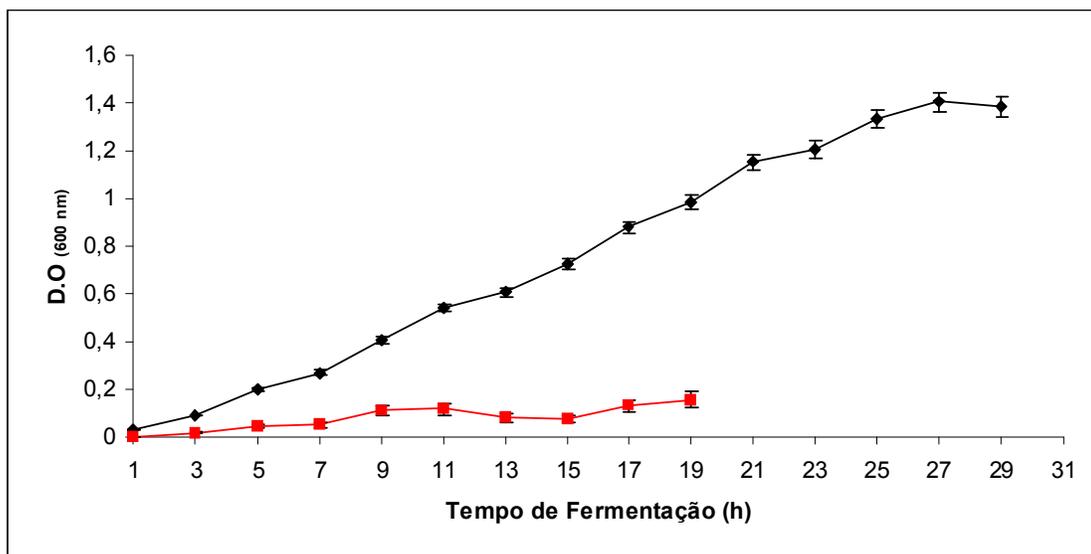


Figura 5. Cinética de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614. Meio de cultura (por L): 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3% v/v de glicerol. Em (▲) Erlenmeyers, 50 mL de meio, 30 °C e 200 rpm e (■) Biorreator Bioflo III, 3,5 L de meio 30°C, 200 rpm, aeração 3,0 L/min.

Como pode ser observado, o crescimento de *P. aeruginosa* no biorreator foi muito menor, além de apresentar algumas oscilações. Este fato pode ser explicado pela grande formação de espuma (*foaming*) que se observou durante o processo (Figura 6). O *foaming* é causado pela presença de ramnolipídeos e agravado devido ao método de aeração e agitação do reator. A formação de espuma é um grande problema na produção desses compostos por FS, pois junto com a espuma, que sai do reator, há saída e conseqüente perda de nutrientes, produtos e biomassa, reduzindo a produtividade, ou até mesmo inviabilizando a fermentação (YEH *et al.*, 2006, LEE & KIM, 2004). De fato, após 20 h de fermentação, a quantidade de espuma formada estava além da capacidade volumétrica do reator, de forma que o grande aumento da pressão levou à ejeção do conteúdo fermentado, impossibilitando a continuidade da fermentação. Assim, pode-se verificar as limitações da FS para a obtenção de ramnolipídeos em biorreator.



Figura 6. Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 por fermentação submersa em biorreator (Bioflo-III Fermentor – New Brunswick Scientific), mostrando a grande formação de espumas com menos de 10 h de fermentação. Meio e condições de cultivo ver Figura 5.

A solução para esse tipo de problema pode ser obtida com a utilização de compostos químicos anti-espumantes ou com o desenvolvimento de métodos físicos de contenção e recuperação da espuma formada. Entretanto, os dois métodos podem acarretar na diminuição da eficiência do processo, além de onerarem a produção. Os agentes anti-espumantes podem inibir o crescimento celular, diminuir a taxa de transferência de massa, provocar reações inibitórias e efeitos tóxicos ao microrganismo, além da possibilidade de interferirem na separação e purificação do produto da fermentação (YEH *et al.*, 2006, LEE & KIM, 2004).

Neste contexto, a FES apresenta-se como uma alternativa viável para a produção de biosurfactantes, sem diminuir a eficiência do processo e nem acarretar em aumento de custo, uma vez que na ausência de água livre não há formação de espuma, além da possibilidade da utilização de substratos de baixo custo viabilizando a obtenção biotecnológica desses importantes agentes tensioativos.

5.2. Produção de ramnolipídeos por fermentação em estado sólido: ensaios prévios para a escolha do substrato

A Figura 7 mostra a diminuição da tensão superficial (TS) dos extratos produzidos por *P. aeruginosa* por FES com diferentes substratos. As medidas foram comparadas à TS obtida do extrato no tempo zero de cultivo. Os extratos aquosos obtidos com o bagaço de cana-de-açúcar e com o farelo de girassol apresentaram as maiores diminuições de TS (aproximadamente 55% e 30,5%, respectivamente) após 72 h de cultivo. Os menores valores iniciais de TS para todos os farelos estudados (em torno de 48 mN/m), podem ser explicados pela presença de fosfolipídios na sua composição, que são surfactantes naturais.

Os farelos de canola, algodão e soja apresentaram um abaixamento de TS muito discreto (10,4%, 8,3% e 4,1%, respectivamente). Dessa forma, em um primeiro momento,

foi descartada a possibilidade da utilização desses substratos para a produção de ramnolipídeos. Dificuldades para extração dos ramnolipídeos do farelo de girassol fermentado (grande quantidade de interferentes e óleo residual) impossibilitaram a continuidade do estudo desse substrato.

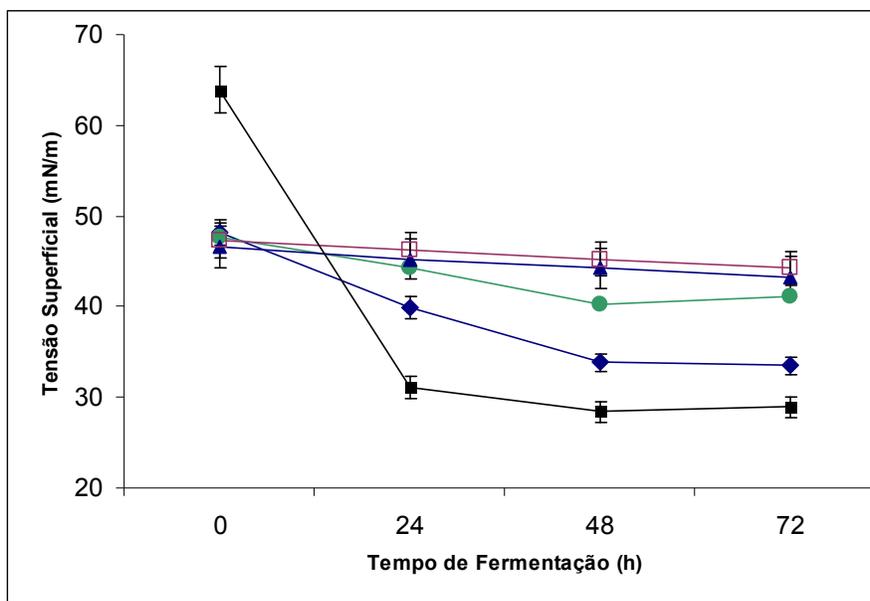


Figura 7. Diminuição da tensão superficial do extrato aquoso de sólidos fermentados por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614: 10 g do substrato seco umedecidos com meio contendo por litro: 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3% v/v glicerol a 30°C; umidade 85% para o bagaço de cana-de-açúcar e 70% para os demais: (●) farelo de canola; (□) farelo de algodão; (▲) farelo de soja; (◆) farelo de girassol e (■) bagaço de cana-de-açúcar.

A partir dos resultados de diminuição da TS, foi escolhido o bagaço de cana-de-açúcar para dar prosseguimento aos estudos. Este substrato, além de apresentar a maior diminuição da TS nos ensaios prévios, produziu um extrato límpido, o que poderia indicar mais facilidade na purificação do biosurfactante. Além disso, é um substrato abundante e de muito baixo custo 15 reais a tonelada segundo a Companhia Nacional de Abastecimento.

5.3. Produção de ramnolipídeos por fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar pode ser obtido nas usinas a partir de colheitas mecanizadas ou manuais. Entretanto, como mostra a Tabela 11, a composição do bagaço não apresenta diferença significativa nos dois tipos de colheita. Dessa forma optou-se pela utilização do bagaço misto, uma mistura dos dois tipos de colheita que geralmente é armazenada nos pátios das usinas, pela maior facilidade na obtenção do substrato, pois não necessita de coleta seletiva.

Tabela 11. Composição de sólidos totais e de açúcares totais e redutores do bagaço de cana-de-açúcar (Fonte: PITARELO, 2006).

	Bagaço de Colheita Mecanizada		Bagaço de Colheita Manual	
	*Água Fria	**Água Quente	Água Fria	Água Quente
Sólidos totais	1,2%	13,8%	1,6%	14,6%
Açúcares totais	0,8%	10,4%	1,3%	10,9%
Açúcares redutores	0,1%	1,5%	0,1%	2,2%

*Extração com água fria: 500 g de bagaço em 10 L de água destilada com agitação intermitente por 48 h

** Extração com água quente: 300 g de bagaço em 150 mL de água a 100 °C em balão de fundo redondo conectado em condensador por 4 h.

Os dois tipos de extração (com água quente e com água fria) apresentados na Tabela 11 mostraram uma diferença muito grande no teor de sólidos totais e de açúcares, dado que, na extração com água quente a quantidade dos açúcares foi maior. Até o presente, não se sabe se a quantidade de açúcares da extração a quente está disponível para o microrganismo durante a fermentação, assim como não sabe se o bagaço está sendo

utilizado apenas como um suporte para o crescimento das células ou se efetivamente os açúcares residuais estão sendo utilizados pela bactéria. Como descrito em Materiais e Métodos (item 4.2.2), neste trabalho o bagaço é autoclavado seco e a solução umedecedora (rica em nutrientes) é adicionada no momento do inóculo.

5.3.1. Comparação da produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em fermentação em estado sólido e fermentação submersa

A partir deste ponto do trabalho utilizou-se os termos biosurfactantes e ramnolipídeos como se fossem sinônimos, considerando que já foi provado anteriormente para esta cepa que o biosurfactante produzido por FS é composto por uma mistura de ramnolipídeos (MONTEIRO *et al.*, 2007).

A Figura 8 mostra o abaixamento da TS e a concentração de ramnose dos extratos (que neste caso expressa a concentração de biosurfactantes) produzidos por *P. aeruginosa* em diferentes tempos de fermentação. Como pode ser observado, o abaixamento da TS é acompanhado pela produção de biosurfactantes pela bactéria, até o ponto em que provavelmente a CMC seja atingida, quando a TS varia muito pouco. A produção máxima de ramnolipídeos (0,85 g/L) ocorreu em 96 h de cultivo, valor que é bastante inferior ao reportado por MONTEIRO *et al.*, (2007), 3,9 g/L, para o cultivo em FS após 216 h. Um aumento do tempo do cultivo em FES pode levar a um aumento na concentração, pois a Figura 7 mostra que, em 96 h, o máximo da produção de biosurfactante ainda não foi atingido.

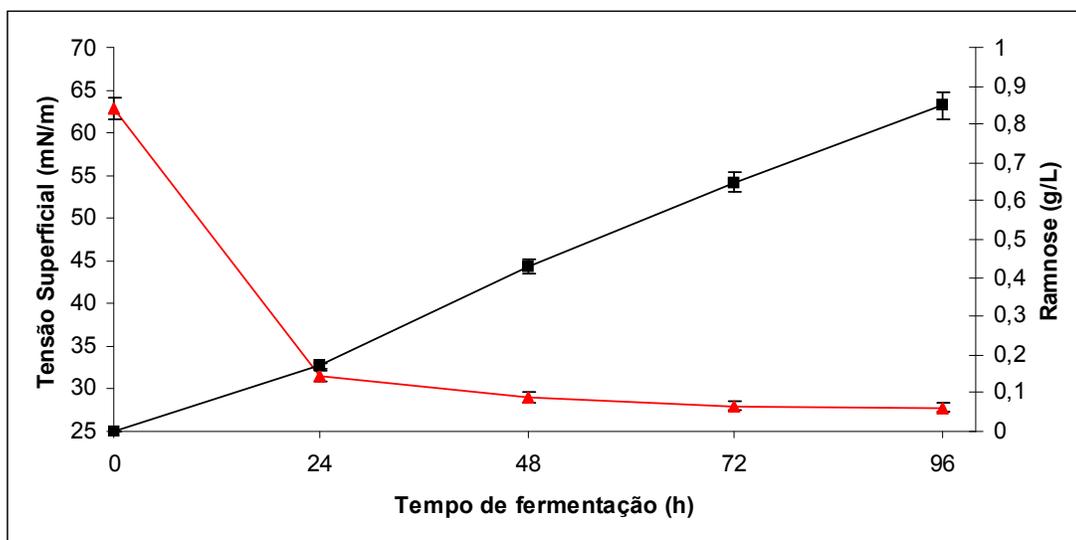


Figura 8. Variação da tensão superficial e do teor de ramnolipídeos durante a produção de biosurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 por fermentação em estado sólido utilizando como substrato o bagaço de cana-de-açúcar. (■) Concentração de Ramnose e (▲) tensão superficial. Experimentos realizados em triplicata em Erlenmeyers de 250 mL contendo 10 g de bagaço de cana-de-açúcar seco umedecido com meio contendo por litro: 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3% v/v de glicerol, incubados em estufa a 30 °C.

O abaixamento da TS em cultivos FS e FES com *P. aeruginosa* realizados paralelamente pode ser observado na Figura 9. A diminuição da TS no sobrenadante do meio fermentado na FS e na água de extração na FES, em diferentes tempos de fermentação, mostra um perfil muito semelhante para os dois tipos de fermentação, com a estabilização dos valores de TS após 24 h de cultivo. Considerando que o meio utilizado em ambas as fermentações é o mesmo (na FES utilizou-se o meio da FS para umedecer o substrato), este resultado já era esperado, e mostra que provavelmente o microrganismo segue a mesma rota metabólica para produção dos ramnolipídeos nos dois tipos de fermentação.

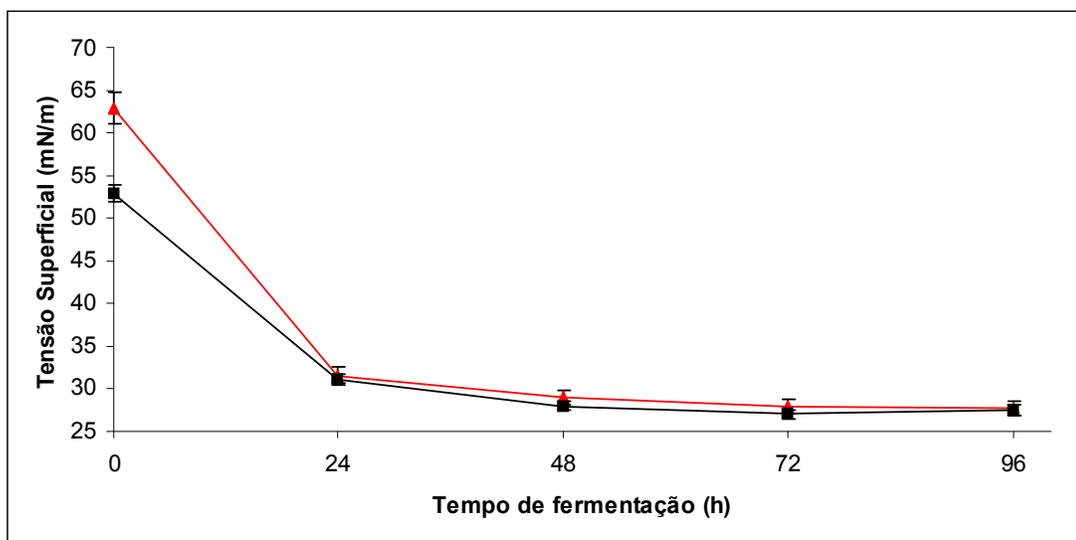


Figura 9. Abaixamento da tensão superficial do extrato produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 em (■) fermentação submersa, FS e (▲) em fermentação em estado sólido, FES, utilizando como substrato o bagaço de cana-de-açúcar. FS: Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio contendo por litro: 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3% v/v de glicerol, incubados a 30°C a 200 rpm. FES: frascos Erlenmeyers de 250 mL com 10 g de bagaço de cana-de-açúcar seco umedecidos com 50 mL do mesmo meio da fermentação submersa, umidade de 85% e incubados em estufa a 30°C.

O experimento de comparação da produção de biosurfactante por FS e por FES foi repetido, desta vez com a quantificação dos ramnolipídeos e aumentando-se o tempo de cultivo. A concentração de ramnolipídeos para o extrato da FES foi calculada com base no volume de meio líquido inicial adicionado para umedecer o bagaço. Assim, os resultados apresentados na Figura 10 mostram uma produção em gramas de ramnose por litro de meio utilizado na FS ou de meio utilizado para umedecer bagaço de cana-de-açúcar na FES. Como observado anteriormente, a produção de ramnolipídeos pelas duas formas de fermentação apresenta um perfil de produção muito semelhante. Ao final de 144 h, a produção foi de aproximadamente 1,6 g/L de ramnose para ambas as técnicas. Neste momento, é importante realçar que a metodologia empregada para a quantificação dos ramnolipídeos na FES depende da extração e purificação parcial do extrato (ver materiais e métodos, item 4.2.3), e que por isso é sujeita a perdas. Assim, os resultados da FES reportam especificamente a quantidade de ramnolipídeos recuperada durante o processo de

purificação e não apenas a produzida durante a fermentação, como é o caso da FS. Observou-se também na Figura 10 que, mesmo após seis dias de cultivo, a produção de ramnolipídeos ainda estava em elevação, o que mostra que um aumento na produção pode ser conseguido com o aumento do tempo de cultivo, o que justificou os experimentos descritos a seguir.

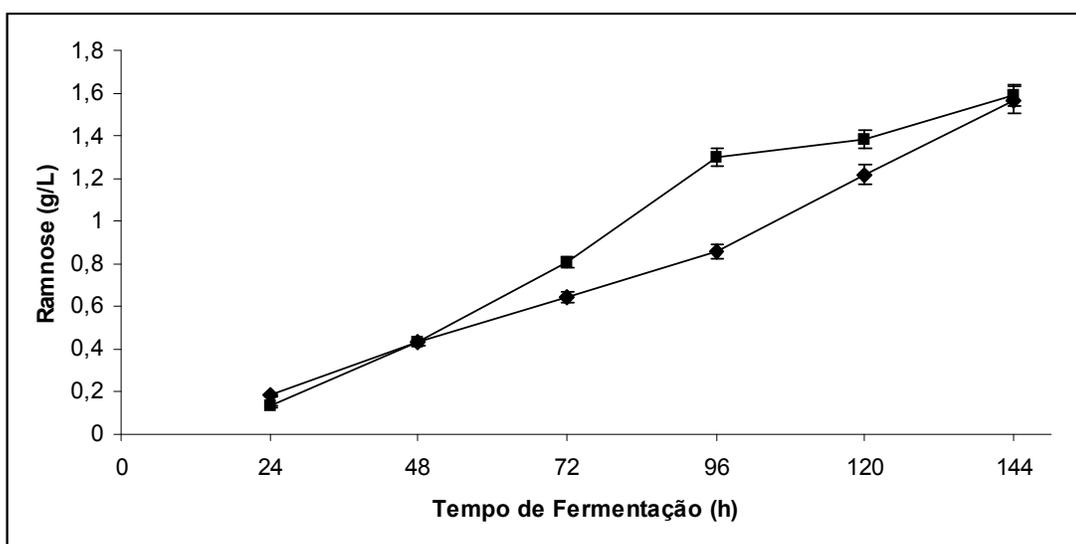


Figura 10. Produção de ramnolipídeos de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 por (♦) fermentação em estado sólido (FES) utilizando com substrato o bagaço de cana-de-açúcar e por (■) fermentação submersa (FS). FS: Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio contendo, por litro: 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3% (v/v) de glicerol, incubados a 30°C a 200 rpm. FES: Erlenmeyers de 250 mL com 10 g de bagaço de cana-de-açúcar seco umedecidos com 50 mL do mesmo meio da fermentação submersa, umidade de 85% e incubados em estufa a 30°C.

5.3.2. Cinética da produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em fermentação em estado sólido

A cinética de produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* em FES foi desta vez seguida por 12 dias, acompanhando-se o teor de ramnolipídeos produzidos (Figura 11). A produção foi expressa por gramas de ramnose por litro de meio de cultura inicialmente

utilizado para umedecer o substrato (g/L) e também por gramas de ramnose por quilograma de bagaço de cana-de-açúcar seco fermentado (g/kg Substrato Seco). Como pode ser visto na Figura 11, obteve-se uma produção máxima de 2,5 g/L, o equivalente a 12,5 g/kg.S.S, com 288 h (12 dias) de fermentação. Entretanto, a produção de ramnolipídeos segue ainda uma tendência crescente, de forma que concentrações superiores a 2,5 g/L de ramnose podem, provavelmente, ser obtidas com tempos de fermentação superiores a 288 h.

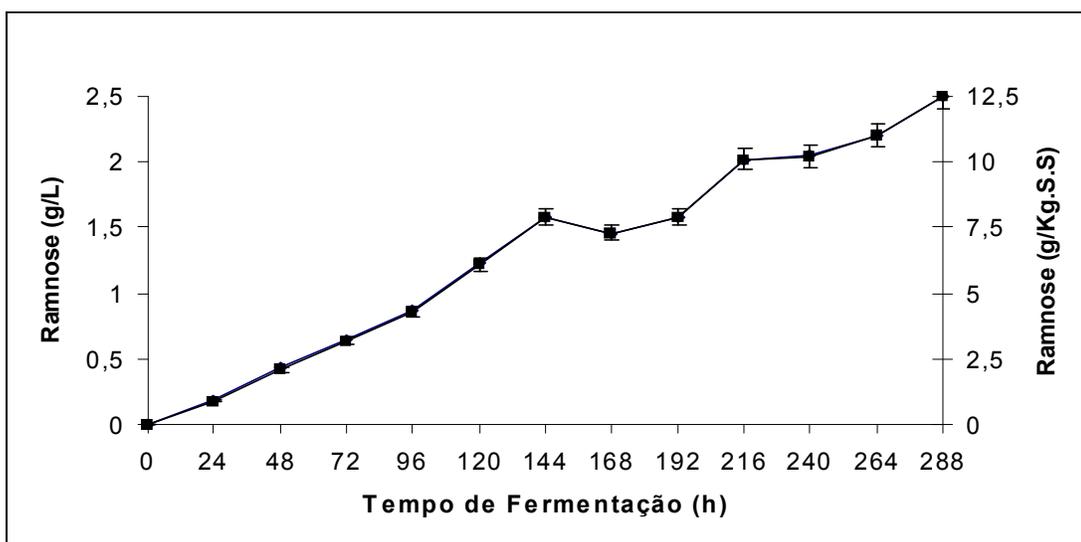


Figura 11. Cinética de produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 por fermentação em estado sólido utilizando como substrato o bagaço de cana-de-açúcar. Experimentos realizados em triplicata em frascos Erlenmeyers de 250 mL com 10 g de bagaço de cana-de-açúcar seco umedecidos com 50 mL de meio contendo por litro: 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3% (v/v) de glicerol, umidade de 85% e incubados em estufa a 30°C.

A Figura 12 mostra a produtividade em mg de ramnose obtidos por litro de meio por hora de fermentação (mg/L/h) ou por mg de ramnose obtidos por quilograma substrato seco por hora de fermentação (mg/kg.S.S./h). Observou-se que a produtividade é quase constante ao longo da fermentação, sendo o melhor valor obtido com 144 h de cultivo 10,96 mg/L/h ou 54,81 mg/kg.S.S./h. Esse resultado pode ser interessante para a decisão sobre que tempo de fermentação será adotado para as próximas fermentações,

considerando tanto a produção (Figura 11) quanto a produtividade (Figura 12), levando-se em conta também a recuperação e a purificação do produto.

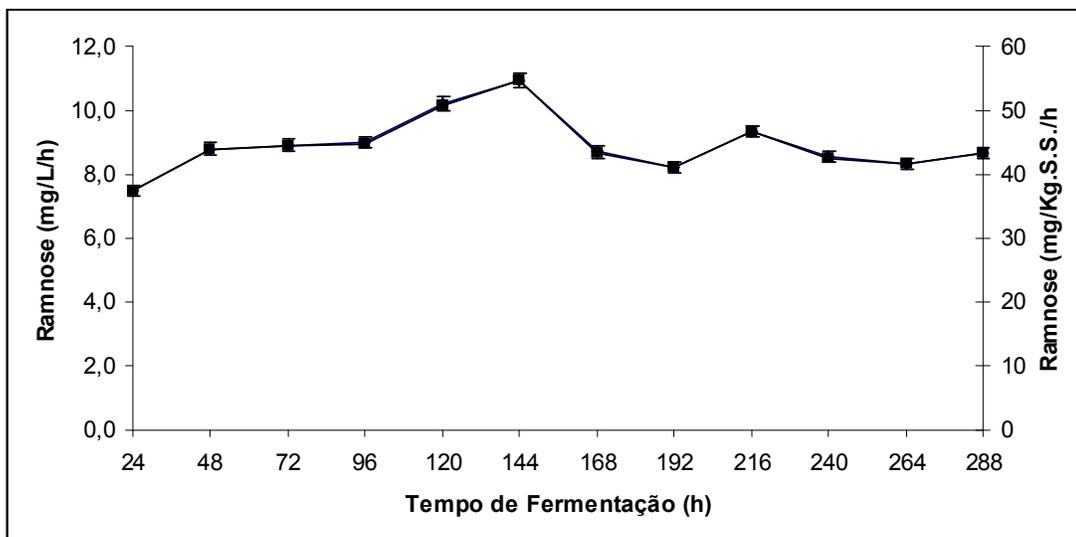


Figura 12. Produtividade de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 por fermentação em estado sólido utilizando como substrato o bagaço de cana-de-açúcar. Experimentos realizados em triplicata em frascos Erlenmeyers de 250 mL com 10 g de bagaço de cana-de-açúcar seco umedecidos com 50 mL de meio contendo por litro: 3,0 g KH_2PO_4 ; 7,0 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3% (v/v) de glicerol, umidade de 85% e incubados em estufa a 30°C.

5.3.3. Efeito da composição do meio umedecedor na produção de ramnolipídeos por fermentação no estado sólido

Esse estudo teve como objetivo testar um resíduo de glicerol (glicerina loura - resíduo da obtenção do biodiesel) fornecido pelo Laboratório de Fitobiomassa do departamento de química da UFPR, assim como verificar a influência dos sais na produção de ramnolipídeos. Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 10 g de bagaço de cana seco umedecidos com 50 mL dos meios, inoculados com 4% (v/v) de pré-inóculo de meio LB e incubados em estufa a 30°C por 288 h. A Figura 13 apresenta os resultados obtidos.

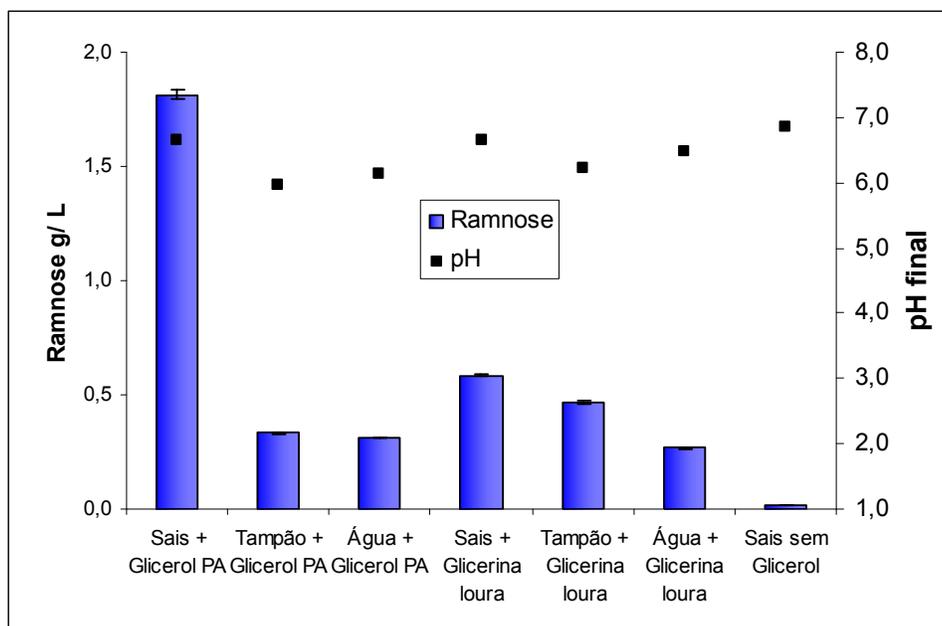


Figura 13. Efeito da composição da solução umedecedora na produção de ramnolípídeos por fermentação no estado sólido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614. Experimentos em Erlenmeyers de 250 mL contendo 10 g de bagaço de cana-de-açúcar seco umedecido com: (1) glicerol (grau analítico) + sais; (2) glicerol (grau analítico) + tampão; (3) glicerol (grau analítico) + H₂O; (4) glicerina loura + sais; (5) glicerina loura + tampão e (6) glicerina loura + H₂O.

Verificou-se (Figura 13) que a pureza do glicerol é determinante na produção de ramnolípídeos, assim como a presença de sais, pois ambos levaram a uma queda de mais de 80% na produção de ramnolípídeos. A substituição do glicerol grau analítico pela glicerina loura levou a uma diminuição muito grande da produção de ramnolípídeos (68% em relação às duas melhores condições dos conjuntos de experimentos: (1) sais + glicerol grau analítico e (2) sais + glicerina loura, o que a princípio inviabiliza a utilização direta desse resíduo, sem etapa prévia de tratamento ou purificação, já que na glicerina loura existe uma grande quantidade de íons sódio resultante do processo de produção de biodiesel por catalise básica, o que possivelmente inibiu o crescimento do microrganismo e a produção de ramnolípídeos por FES.

5.4. DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

5.4.1. Concentração Micelar Crítica (CMC)

A CMC é um importante parâmetro que indica qual é a concentração mínima necessária de biosurfactante em solução para que ocorra um abaixamento máximo de tensão superficial e interfacial, ou seja, quanto menor a CMC, mais eficiente seria o biosurfactante. A concentração micelar crítica (CMC) dos ramnolipídeos produzidos por FES foi determinada pela medida da tensão superficial (mN/m) de diluições sucessivas do extrato aquoso purificado contendo 229 mg/L ramnolipídeos. A CMC, que é dada pelo ponto de inflexão da curva, ocorre quando a tensão superficial do meio é de 30,5 mN/m ou o equivalente a uma concentração de ramnose de 14,3 mg/L (Figura 14), valor este muito próximo ao obtido por MONTEIRO *et al.*, (2007) para o biosurfactante produzido por FS (13,9 mg/L), o que sugere que a composição dos homólogos obtidos seja semelhante para as duas técnicas de fermentação.

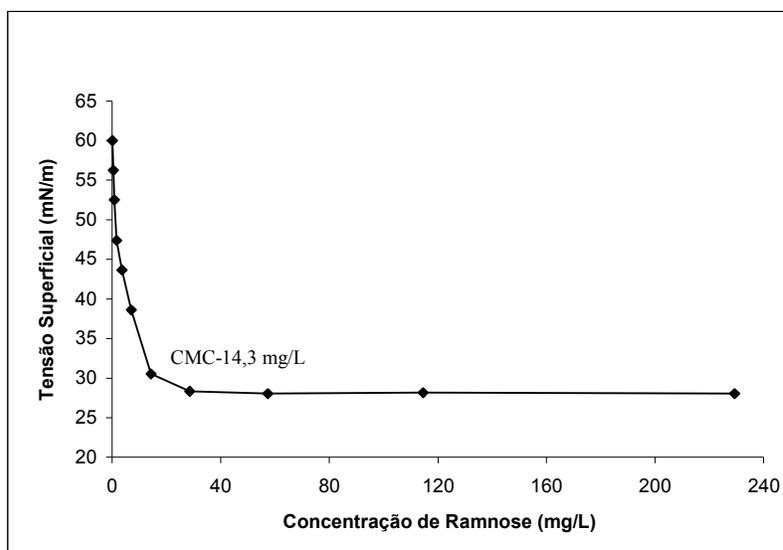


Figura 14. Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) dos ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 por fermentação em estado sólido utilizando como substrato o bagaço de cana-de-açúcar, em função da tensão superficial (mN/m), utilizando-se diluições sucessivas do extrato purificado.

5.4.2. Índice de emulsificação (E)

O extrato purificado contendo 1,2 g/L de ramnolipídeos foi utilizado para a determinação do Índice de Emulsificação (E). A Figura 15 apresenta os valores de E_{24} obtidos para a gasolina (83%), óleo diesel (75%) e tolueno (77%), sendo o menor valor obtido para o querosene (44%). Estes resultados mostram que os ramnolipídeos de *P. aeruginosa* produzidos por FES possuem uma excelente capacidade emulsificante, sendo esta muito semelhante à obtida por MONTEIRO *et al.*, (2007) o que confirma a viabilidade de desenvolvimento de diferentes aplicações, sobretudo as ambientais, (NISTSCHÉ *et al.*, 2005b) desse tensoativo produzido por FES.

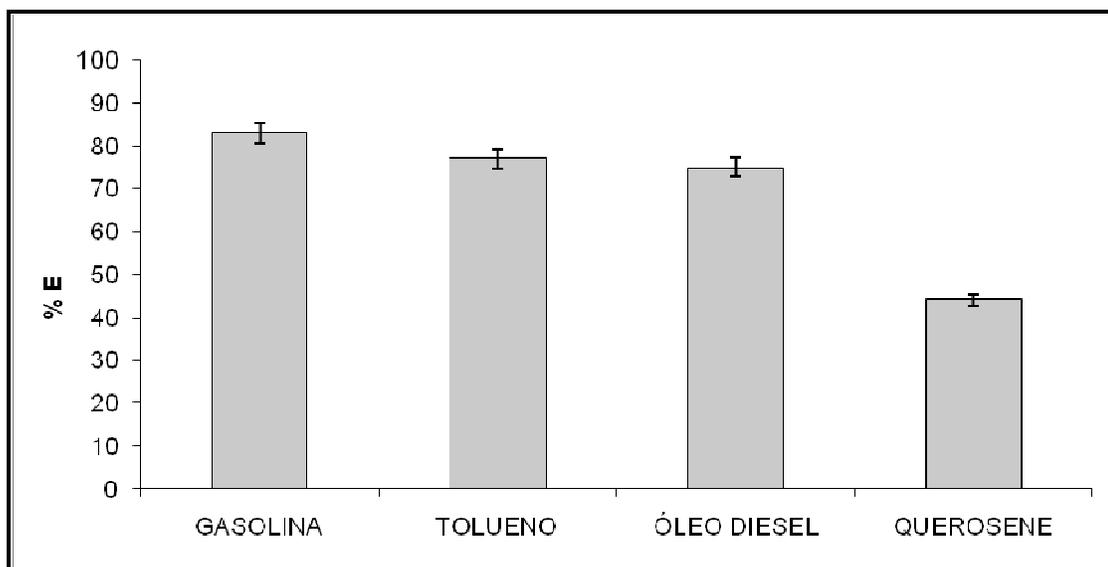


Figura 15. Determinação do Índice de Emulsificação (E_{24}) após 24 h do biosurfactante obtido de um extrato purificado (1,2 g/L) produzido por FES frente a diferentes hidrocarbonetos.

5.5. TRATAMENTO DE SOLOS CONTAMINADOS COM HIDROCARBONETOS

5.5.1 Verificação da eficiência do biosurfactante por determinação da demanda química de oxigênio (DQO) dos extratos aquosos do solo

O biosurfactante utilizado nestes experimentos foi produzido por FES, sendo utilizado o extrato bruto livre de células, com tempo de cultivo de 288 h (12 dias). A eficiência de remoção dos compostos foi verificada pela determinação da DQO dos eluatos do solo lavado com soluções de biosurfactante e comparados com o mesmo tipo de experimento usando água. Um aumento nos valores da DQO indica remoção de matéria orgânica e pode ser correlacionado com a eficiência do biosurfactante. Os controles realizados foram: (1) lavagem com água pura do solo contaminado com gasolina; (2) lavagem com água pura do solo não contaminado e (3) solução de biosurfactante, lavagem de solo não contaminado.

A Figura 17 mostra os valores de DQO para os eluatos obtidos a partir de amostras de solo contaminadas com gasolina e os respectivos controles. Pode-se observar que o biosurfactante foi capaz de remover 64 % a mais de matéria orgânica que os experimentos realizados com água. A extração de matéria orgânica do solo com 24 h e com 48 h se manteve constante para todos os experimentos, mostrando que não é necessário mais que 24 h de contato dos ramnolipídeos com o solo para a máxima remoção de matéria orgânica.

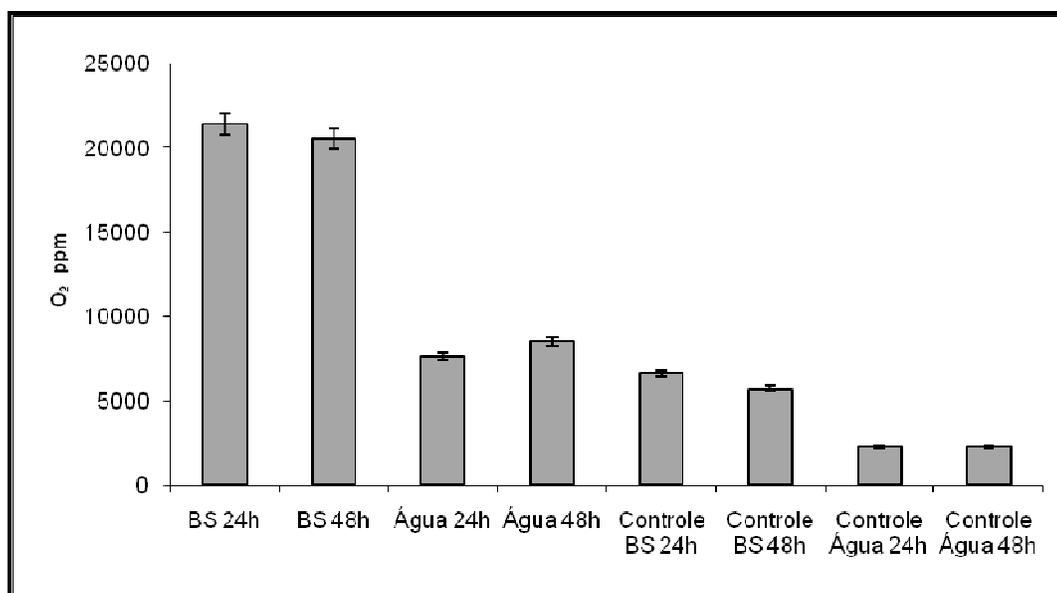


Figura 16. Eficiência da lavagem de solos contaminados com gasolina com o biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 em fermentação no estado sólido, avaliada pela determinação da demanda química de oxigênio (DQO) dos extratos aquosos do solo. Ensaio com 20 g de solo e: (1) BS, ramnolipídeos + 2% (v/m) gasolina; (2) controle água + 2% (v/m) gasolina; (3) Controle BS, ramnolipídeos + 0% gasolina; (4) Controle, água + 0% gasolina. Os Erlenmeyers ficaram em agitador orbital a 150 rpm, 25°C por 24 h e 48 h.

Estudos de CONTE *et al.*, (2005) utilizando os surfactantes químicos dodecilsulfato de sódio (SDS) e Triton X-100 apresentaram uma eficiência de remoção de hidrocarbonetos aromáticos do solo em um sistema de lavagem do solo, quando comparados com a remoção pela água, de aproximadamente 80%. Entretanto, a comparação deste valor com os obtidos no presente trabalho fica dificultada pois foram utilizados diferentes métodos para a verificação da eficiência do biosurfactante (método de extração de Soxhlet utilizando como sistema de solventes acetona/n-hexano (1:1), 48h) A vantagem de se trabalhar com biosurfactantes se dá pelo fato dos surfactantes biológicos serem biodegradáveis e de baixa toxicidade quando comparada com surfactantes químicos (COSTA *et al.*, 2006).

5.5.2 Verificação da eficiência do biosurfactante por determinação de hidrocarbonetos voláteis por cromatografia a gás sistema headspace

Os hidrocarbonetos voláteis dos eluatos foram analisados por cromatografia a gás (sistema headspace). A Figura 17 mostra a remoção de hidrocarbonetos voláteis (benzeno, tolueno, etilbenzeno, *m,p*-Xileno e *o*-Xileno) do solo contaminado após lavagem com solução de biosurfactante comparada à lavagem com água.

Observou-se que o biosurfactante foi muito mais eficiente na remoção de hidrocarbonetos voláteis, sendo capaz de remover até 88% a mais do que a água nas mesmas condições experimentais. Este resultado pode ser explicado pelo bom índice de emulsificação dos ramnolipídeos frente a vários compostos, mostrado na Figura 15, onde o melhor resultado foi obtido para a gasolina $E_{24} = 83\%$.

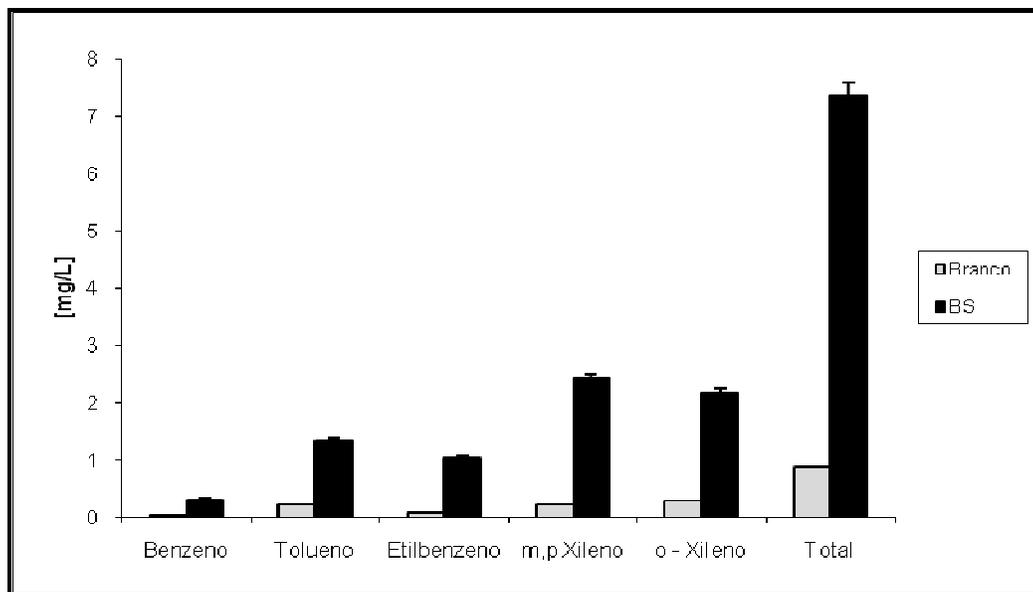


Figura 17. Determinação dos hidrocarbonetos voláteis por cromatografia a gás em sistema *headspace* de amostras da lavagem do solo com soluções do biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614. Condições: 20 g de solo contaminado 2% (v/m) de gasolina e com lavado com: ■ água (controle), ■ BS: ramnolipídeos.

Os relatos encontrados na literatura sobre a lavagem de solos contaminados com petróleo e seus derivados com biosurfactantes é muito escassa. URUM & PEKDEMIR, (2004) utilizaram um sistema de lavagem de solos para a remoção de óleo cru do solo utilizando SDS (dodecilsulfato de sódio) e ramnolipídeos produzidos por fermentação submersa para a remoção e observaram resultados semelhantes para os dois compostos (70-80% de remoção). URUM *et al.* (2005) estudaram a remoção de petróleo de um sítio contaminado usando sistema de lavagem do solo associado à flotação, similar aos processos usados em áreas de mineração. Neste estudo, dois tipos de surfactantes glicolipídeos e lipopeptídeos foram usados, além da avaliação dos modos de lavagem, agitação e “*air sparging*”. Os resultados demonstraram que o melhor resultado foi obtido com o surfactante dodecilsulfato de sódio, atingindo índices de remoção do óleo maiores que 80%.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a utilização do biosurfactante produzido por *P. aeruginosa* para a remoção de hidrocarbonetos do solo é vantajosa e confirmam a viabilidade da utilização do biosurfactante produzido por *P. aeruginosa* UFPEDA 614 em aplicações voltadas à área do petróleo.

6. CONCLUSÕES

Os estudos realizados permitiram esclarecer aspectos sobre a produção de biosurfactante por *P. aeruginosa* UFPEDA 614 utilizando a fermentação no estado sólido, bem como de sua aplicação na lavagem de solos contaminados com gasolina. As principais conclusões decorrentes do presente trabalho são:

(I) Otimização da metodologia de extração, purificação parcial e dosagem do biosurfactante produzido por FES

No início deste trabalho, um dos principais entraves era a dosagem do biosurfactante produzido por FES, considerando que os substratos (matrizes complexas que contêm inúmeros componentes) utilizados normalmente interferiam na quantificação indireta do biosurfactante (dosagem de ramnose pelo método fenol-sulfúrico). Foi otimizada a metodologia, que consistiu na extração do biosurfactante do material fermentado com CHCl_3 , evaporação do solvente, solubilização em água e quantificação pelo método fenol-sulfúrico.

(II) Otimização da produção de biosurfactantes

O melhor substrato foi o bagaço de cana-de-açúcar umedecido com solução de sais e adicionado de glicerol, com a máxima produção de 2,5 g/L de extrato parcialmente purificado ou 12,5 g/kg.S.S de ramnolipídeos após 12 dias de fermentação.

A produção de ramnolipídeos por fermentação no estado sólido usando o bagaço de cana-de-açúcar apresentou um perfil de produção semelhante ao obtido por fermentação submersa, com a máxima redução da tensão superficial após 24 h (28 mN/m), sendo

obtidos os mesmos teores (1,6 g/L) de biosurfactantes após seis dias de cultivo, comparando-se volumes da solução umedecedora inicial do substrato para a FES e o volume de meio da FS. Neste caso, ressalta-se que as dosagens da FES foram feitas num extrato parcialmente purificado, que inclui as perdas durante o processo de purificação, enquanto que na FS a dosagem é feita sem purificação prévia. Estes resultados mostram a viabilidade de utilização do processo de FES para a produção do biosurfactante.

(III) Caracterização do biosurfactante por técnicas físico-químicas

As propriedades físico-químicas dos ramnolipídeos produzidos por FES são muito semelhantes aos obtidos pelos ramnolipídeos produzidos por FS, com valores de CMC de 14,3 mg/L e o melhor índice de emulsificação após 24 h de 83% para a gasolina.

(IV) Estudos de aplicação do biosurfactante na lavagem de solos contaminados com gasolina

A utilização dos ramnolipídeos mostrou-se viável para a lavagem de solos contaminados com gasolina, sendo 88,0 % mais eficiente do que a água na remoção de hidrocarbonetos voláteis e não voláteis, segundo a determinação por cromatografia gasosa em sistema *headspace* dos eluatos. Quando a matéria orgânica contida nos eluatos do solo foi avaliada por DQO, obteve-se 64,2 % mais de eficiência em relação ao uso da água nas mesmas condições, o que confirma a viabilidade de desenvolvimento de diferentes aplicações, sobretudo as ambientais do biosurfactante de *P. aeruginosa* produzido por fermentação no estado sólido

7. TRABALHOS FUTUROS

Este é um trabalho que abre muitas novas perspectivas. Trabalhos futuros poderão abordar os seguintes temas:

- Estudos para o aumento da produtividade do biosurfactante por fermentação no estado sólido, com a utilização de novos substratos e indutores.
- Estudos do aumento de escala do processo de produção do biosurfactante por fermentação no estado sólido.
- Determinar a composição molecular e estrutural dos ramnolipídeos produzidos por fermentação no estado sólido e compará-las com a mistura de homólogos obtidos por fermentação submersa.
- Isolar as frações majoritárias da mistura de homólogos, verificar a relação estrutura-função e estudar as propriedades físico-químicas de cada fração ou de cada ramnolipídeo isolado.
- Aprofundar os estudos de aplicações ambientais desses biosurfactantes relacionadas à área do petróleo, como por exemplo, determinando-se o seu potencial de biorremediação de solos contaminados com petróleo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALOS, A.; PINAZO, A.; INFANTE, M.R.; CASALS, M. GARCIA; F. AND MANRESA, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. **Langmuir**, v. 17, p. 1367-1371, 2001.

ARARUNA, J. T.; PORTES, V. L. O.; SOARES, A. P. L.; SILVA, M. G.; STHEL, M. S.; SCHRAMM, D. U.; TIBANA, S.; VARGAS, L. Oil spills debris clean up by thermal desorption. **Journal of Hazardous Materials**. v. 110, p.161-171, 2004

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

BANAT, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A Review. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 1-12, 1995.

BECHER, P. Emulsions, theory and practice. **Reinhold Publishing**, New York. v. 2, 1-9, 1965.

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

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

BILSTAD, T.; ESPEDAL, E.; Membrane of produced water. **Water Science and Technology**.v. 34, p. 239-246, 1996.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A**, v. 152, p. 41-52, 1999.

BONO, R.; BUGLIOSI, E. H.; SCHILIRÒ, T.; GILLI, G. The Lagrange Street story: the prevention of aromatics air pollution during the last nine years in an European city. **Atmospheric Environment 35 Supplement**. v. 1, p. 107-113, 2001.

BORDAS, F.; LAFRANCE, P.; VILLEMUR, R. Conditions for effective removal of pyrene from an artificially contaminated soil using *Pseudomonas aeruginosa* 57SJ rhamnolipids. **Environmental Pollution**, v. 138, p. 69-76, 2005.

CALVO, C.; TOLEDO, F. L.;LÓPEZ-GONZÁLEZ, J. Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. **Journal of Biotechnology**. v. 109, p. 255-262, 2004.

CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2195-2210, 2006.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 262-266, 2004.

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

CARRILO, P. G. Isolation and selection of biosurfactant-producing. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 12, p. 82-84, 1996.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I.B. Microbial surfactants and their use in fuel studies of soil remediation. **Journal Applied Microbiology**, v. 93, p. 915-929, 2002.

CONTE, P.; AFRETTO A.; SPACCINI R.; PICCOLO A. Soil remediation: humic acids as natural surfactants in the washings of highly contaminated soils. **Environmental Pollution**, v. 135, p. 515-522, 2005.

COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-Active agents from two *Bacillus* species. **Applied Environmental Microbiology**, v.53, p.224-229, 1987.

CORSEUIL, H. X.; HUNT, C.S.; FERREIRA DOS SANTOS, R. C.; ALVAREZ, P. J.J. The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation. **Water Research**. v. 32, p. 2065-2072, 1998.

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

COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry- A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291-302, 2006.

DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: some industrial applications of biosurfactants. **Process Biochemistry**, accepted manuscript, p. 1-29, 2007.

DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Characterization of biochemical properties and biological activities of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid and non-mucoid strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil samples. **Applied Microbiology and Cell Physiology**, v. 69, p. 192-199, 2005.

DESHPANDE, S.; SHIAU, J. B.; WANDE, D.; SABATINI, A. D.; HARWELL, H. J. Surfactant selection for enhancing *ex situ* soil washing. **Water Research**. v. 33, p. 351-360, 1999.

DÉZIEL, E.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; VILLEMUR, R. Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *P. aeruginosa* strain 57RP. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1485, p. 145-152, 2000.

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

FANG, J.; BARCELONA, M. J. Coupled oxidation of aromatic hydrocarbons by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. **Chemosphere**. v. 50, p. 105-109, 2003.

FOX, S.L. & BALA, G.A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 235-240, 2000.

GUERRA-SANTOS, L.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 301-305, 1984.

HABA, E.; A. PINAZO.; JÁUREGUI, O.; ESPUNY, M.J.; INFANTE, M.R.; M. MANRESA A. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBI 40044. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, p. 316-322, 2003.

HALMEMIES, S.; GRONDAHL, S.; NENONENS, K.; TUHKANEN, T. Estimation of the time periods and processes for penetration of selected spilled oils and fuels in different soils in the laboratory. **Spill Science & Technology Bulletin**. V. 8, p.451-465, 2003

HIGARASHI, M. M. Processos oxidativos avançados aplicados à remediação de solos brasileiros contaminados com pesticidas. **Tese (Doutorado)**, Campinas, 1999.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301-306, 2005.

HOLMBERG, K. Natural Surfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 6, p. 148-159, 2001.

JACOBUCCI, D.F.C. Estudo da influência de biosurfactantes na biorremediação. **Tese (Doutorado)** – UNICAMP, Campinas, 2000.

JARVIS, F.G.; JOHNSON, M.J. A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of American Chemistry Society**, v. 71, p. 4124-4126, 1949.

JAVAHERI, M.; JENNEMAN, G.E.; MCINNEREY, M.J.; KNAPP, R.J. Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, p. 698–700. 1985.

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

KHAN, I. F.; HUSAIN, T.; HEJAZI, R.; An overview and analysis of site remediation technologies. **Journal of Environmental Management**. v. 71, p. 95-122, 2004.

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

LANG, S. & WAGNER, F. Structure and properties of biosurfactants. **Biosurfactants and Biotechnology**. MD Kosaric, N Cairns, WL Gray, N.C.C. (Eds.), New York, p. 21–45, 1987.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnose lipids – biosynthesis, microbial production and application potential. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 51, p. 22-32, 1999.

LEE, B.S.; KIM, E.K. Lipopeptide production from *Bacillus* sp. GB16 using a novel oxygenation method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 639–647, 2004.

LEE, K.M.; HWANG, S.H.; HA, S.D.; JANG, J.H.; LIM, D.J.; KONG, J.Y. Rhamnolipid production in batch and fed-batch fermentation using *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 9, p. 267-273, 2004.

LINHARDT, R.J.; BAKHIT, R.; DANIELS, L.; MAYERL, F.; PICKENHAGEN, W. Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose. **Biotechnology Bioengineering**, v. 33, p. 365-368, 1987.

LUCHESE, B. E.; FAVERO, B. O. L.; LENZI, E. **Fundamentos da Química do Solo** 1^a edição, 2001.

LYCZAK, J.B.; CANNON, C.L. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1051-1060, 2000.

MACKAY, D. M.; WILSON, R. D.; BRWN, M.J.; BALL, W.P.; XIA, G.; DURFEE, D. P. A controlled field evaluation of continuous vs. pulsed pump-and-treat remediation of a VOC-contaminated aquifer: site characterization, experimental setup, and overview of results. **Journal of Contaminated Hydrology**. v. 41, p. 81-131, 2000.

MAIER, R.M., SOBERÓN-CHÁVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 54, p. 625-633, 2000.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strain at thermophilic conditions. **Journal American Oil Chemistry Society**. v.74, n.7, p. 887-889, 1997.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA. S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 58, p. 428-434, 2002.

MANN, J. M. Full-scale and pilot-scale soil washing. **Journal of Hazardous Materials**. v. 66, p. 119-136, 1999.

MANZOCHI, C. De olho nos postos de abastecimento. **Ciência Hoje**. v. 29, p. 40, 2001.

MATA-SANDOVAL, J.C.; KARNS, and TORRENTS, A. Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UG2. **Microbiology Research**, v. 155, p. 249-256, 2001.

MATSUFUJI, M.; NAKATA, K.; YOSHIMOTO, A. High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol. **Biotechnology Letters**, v. 19, p. 1213-1215, 1997.

MESQUITA, C. A. Uso de técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes. **Tese (Doutorado)**, Rio de Janeiro, 2004.

MITCHELL, D., A (Org.) ; KRIEGER, N. (Org.) ; BEROVIC, M. (Org.) . **Solid state fermentation bioreactors: Fundamentals of design and operation**. 1ª. ed. Heidelberg: Springer, v. 01. 447 p. 2006.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of solid state bioprocessing. **Biotechnology Annual Review**, v. 8, p. 183-225, 2002.

MITCHELL, D.A.; VON MEIEN, O.F.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 137-147, 2003.

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

MOO-YOUNG, M.; MOREIRA, A.R.; TENGGERDY, R.P. Principles of the solid substrate fermentation. In: **Filamentous Fungi**. 4. Ed. JE Smith, DR Berry and B Kristianse, E Arnold. (eds.). p. 117 – 144, 1983.

MULLER-HURTIG, R.; Wagner F., Blaszyk, R., Kosaric, N. Biosurfactants for environmental control. In: Kosaric, N. (ed) Biosurfactants- Production, properties and

applications. **Surfactant science series**. Eds. Marcel Dekker. New York, v. 48, p. 447-469, 1993.

MULLIGAN, C.; YONG, N. R.; GIBBS, F. B. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**. v. 60, p. 371-380, 2001.

MULLIGAN, C.N. Environmental application for biosurfactants **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

MULLIGAN, C.N. & GIBBS, B.F. Factors influencing the economics of biosurfactants. **Biosurfactants, Production, Properties, Applications**. Marcel Dekker Kosaric, N. (Ed.), New York, p. 329–371, 1993.

MULLIGAN, C. N.; EFTEKHARI, F. Remediation with surfactant foam of PCP contaminated soil. **Engineering Geology**, v. 70, 269-279p, 2003.

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

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O.; CONTIERO, J. Rhamnolipid surfactants: An update on the general aspects of these remarkable biomolecules. **Biotechnological Progress**, v. 21, p. 1593-1600, 2005a.

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O.; HADDAD, R.; GONÇAVES, L.A.G.; EBERLIN, M.; CONTIERO, J. Oil waste as unconventional substrate for rhamnolipid biosurfactant

production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnological Progress**, v. 21, p. 1562-1566, 2005b.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

OBERBREMER, A.; MULLER-HURTIG, R.; WAGNER, F. Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 32, p. 485–489, 1990.

OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin a and surfactin by a dual producer, *Bacillus* RB14, in solid-state fermentation **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, p. 517-519, 1995.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p.81-84, 2003.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCOOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 29, p. 119-131, Part 2, 1999.

PARRA, J.L.; GUINEA, J.; MANRESA, A.; ROBERT, M.; MERCADE, M.E. COMELLES, F.; BOSCH, M.P. Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.66, p. 141-145, 1989.

PESO-AGUIAR, M. C.; SMITH, D. H.; ASSIS, R.C. F.; SANTA-ISABEL, L. M.; PEIXINHO, S.; GOUVEIA, E. P., ALMEIDA, T. C. A.; ANDRADE, W. S.; CARQUEIJA, C. R. G. KELMO, G.; RODRIGUES. C.V.; CARVALHO, G. C.; JESUS, A. C. S. Effects of petroleum and its derivatives in benthic communities at Baía de Todos os Santos/Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. **Aquatic Ecosystem Health and Management**. v. 3, p. 459-470, 2000.

PITARELO, A., **Relatório Anual apresentado a Pós-graduação em Química**, Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, p. 55, 2006.

REILING, H.E.; THANEI-WYSS, U.; GUERRA-SANTOS, L.H.; HIRT, R.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p. 985-989, 1986.

RAHMAN, K.S.M.; RAHMAN, T.J.; KOURKOUTOAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresource Technology**, v. 90, 159-168p, 2003.

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

ROSEN, M.J. Surfactants and interfacial phenomena. **John Wiley and Sons**, New York, 1978.

SAMSON, R.; CSEH, T.; HAWARI, J.; GREER, C.W.; ZALOUM, R. Biotechnologies applique' es a` la restauration de sites contamine' s avec d'application d'une technique physico chimique et biologique pour les sols contamine's par des BPC. **Science et Techniques de l'Eau**. v. 23, p. 15–18, 1990.

SANTA ANNA, L.M.; SEBASTIAN, G.V.; MENEZES, E.P.; ALVES, T.L.M.; SANTOS, A.S.; PEREIRA JR, N.; FREIRE, D.M.G. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* pal isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, p. 159-166, 2002.

SANTOS, C. F. C. Seleção de linhagem de levedura produtora de biosurfactante e estudo fermentativo para sua produção. **Dissertação (Mestrado)**, Campinas, 1997.

SATO, K.; SHIGETOSHI, S. Small-scale solid-state fermentations. In: **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. A.L. Demain & J.E. Davies (eds) 2nd ed. ASM Press, Washington DC, pp. 61-79, 1999.

SCHIANETZ, B. **Passivos Ambientais Curitiba**: SENAI, 1999.

SHEPPARD, J.D., MULLIGAN, C.N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis*. grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 27, p. 110-116, 1987.

SIDHU, K. S. Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**.v. 38, p. 336-344, 2003.

SILVA, R. L. B.; BARRA, C. M.; MONTEIRO, T. C. N.; BRILHANTE, O. M. Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis conseqüências para a saúde pública no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro. **Caderno Saúde Pública, Rio de Janeiro**. v. 18, p. 1599-1607, 2002.

SINGH, A.; VAN HAMME, J.D.; WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: part 2. Applications aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 99-121, 2007.

SMITH, R.D.; IGLEWSKI, B.R. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 56-60, 2003.

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

SOUZA, M. N. **Experimentos de Físico-Química**, 2º ed., Curitiba: Neoprinte Ltda. p. 24-25, 1995.

STRAUBE, W. L.; JONES-MEEHAN, J.; PRITCHARD, P. H.; JONES, W. R. Bench-scale optimization of bioaugmentation strategies for treatment of soils contaminated with high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons. **Resources, Conservation and Recycling**. v. 27, p. 27-37, 1999.

SYLDATK, C.; WAGNER, F. Production of biosurfactants. In: Kosaric, N.; Cairns, W.J.L. **Biosurfactants and Biotechnology**. Eds. Marcel Dekker: New York. v. 25, 342 p.p. 89-119, 1985.

STANGHELLINI M.E.; MILLER, R.M. Biosurfactants – their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. **Plant Disease.**, n. 81, p. 4-12, 1997.

TEAS, C.; KALLIGEROS, S.; ZANIKOS, F.; STOURNAS, S.; LOIS, S.; ANASTOPOULOS, G. Investigation of the effectiveness of absorbent materials in oil spills clean up. **Desalination**. v.140, p. 259-264, 2001.

TIBURTIUS, E. R. L.; ZAMORA, P. P.; EMMEL A. Treatment of gasoline-contaminated waters by advanced oxidation processes. **Journal of Hazardous Materials** B126, p. 86 – 90, 2005.

URUM, K.; PEKDEMIR, T.; Evaluation of biosurfactantes for crude oil contaminated soil washing. **Chemosphere**. v. 57, p. 1139-1150, 2004.

URUM, K.; PEKDEMIR, T.; ROSS, D.; GRIGSON, S. Crude oil contaminated soil washing in air sparging assisted stirred tank reactor using biosurfactants. **Chemosphere**. v. 60, p. 334-343, 2005.

VAN HAMME, J. D., SINGH, A., WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 1. physiological aspects. **Biotechnology Advances**; 24: 604–620, 2006.

VEENANADIG, N.K.; GOWTHAMAN, M.K.; KARANTH, N.G.K. Scale up studies for the production of biosurfactant in packed column bioreactor. **Bioprocess Engineering**, v. 22, p. 95-99, 2000.

WATTS, R.J.; HALLER, D. R.; JONES, A. P.; TEEL, A. L. A foundation for the risk-based treatment of gasoline-contaminated soils using modified Fenton's reactions. **Journal of Hazardous Materials B**, v. 76, p. 73-89, 2000.

YEH, M. S.; WEI, T. H.; CHANG, J. S. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1799-1805, 2006.

YOUSSEF, N.H.; DUNCAN, K.E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K.N.; KNAPP, R. M.; MCINERNEY, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 339-347, 2004.

ZAJIC, J.E.; SEFFENS, W. Biosurfactants. **Critical Review in Biotechnology**, v. 1, p. 87-107, 1984.

ZUCCARI, M. L. A digestão pelo "calor de diluição" e a determinação da demanda química de oxigênio (DQO) em águas e efluentes. **Tese (Doutorado)**, Botucatu, 1996.