



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**



**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES UTILIZANDO MELAÇO DE  
SOJA**

**MARÍLIA SILVA RODRIGUES**

Uberlândia – MG

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**



## **PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES UTILIZANDO MELAÇO DE SOJA**

**Marília Silva Rodrigues**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Miriam Maria de Resende**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

**Uberlândia – MG**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

R696p      Rodrigues, Marília Silva, 1989-  
2016      Produção de biossurfactantes utilizando melão de soja / Marília  
Silva Rodrigues. - 2016.  
90 f. : il.

Orientador: Miriam Maria de Resende.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.  
Inclui bibliografia.

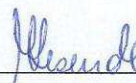
1. Engenharia química - Teses. 2. Química de superfície - Teses.  
3. Solução (Química) - Teses. 4. Físico-química - Teses. 5. Bactérias  
gram-negativas - Teses. I. Resende, Miriam Maria de. II. Universidade  
Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
Química. III. Título.

CDU: 66.0

---

DISSERTAÇÃO DE Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, em 22 de julho de 2016.

BANCA EXAMINADORA:



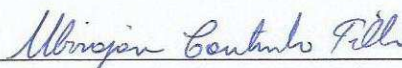
---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Miriam Maria de Resende  
Orientadora (PPGEQ/UFU)



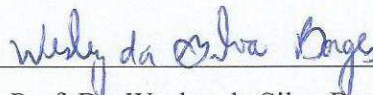
---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vicelma Luiz Cardoso  
(PPGEQ/UFU)



---

Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho  
(PPGEQ/UFU)



---

Prof. Dr. Wesley da Silva Borges  
(ILES/ULBRA)

Aos meus pais, irmãos e namorado.

---

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço a Deus por todas as bênçãos e saúde que me deram condições de trilhar meu caminho.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Miriam Maria de Resende pela oportunidade, orientação, paciência e ensinamentos compartilhados.

Aos professores doutores Vicelma Luiz Cardoso e Ubirajara Coutinho Filho por toda a disponibilidade e inúmeras contribuições ao trabalho desenvolvido.

Ao Prof. Dr. Wesley da Silva Borges por toda colaboração.

Ao Prof. Dr. Waldomiro Borges Neto pela atenção e uso do laboratório de quimiometria.

Aos meus pais, Aguinaldo e de Lourdes, por darem total apoio, amor e incentivo, sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus irmãos, Guilherme e Fred pelo carinho, incentivo e preocupação de sempre.

Ao meu namorado Deivison, pela compreensão da minha ausência nestes dois anos, pelo carinho e companheirismo ao longo da vida, seu apoio foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

Aos meus tios Sidney e Beth pelo suporte e cuidado ao longo desta jornada.

Aos amigos Felipe, Letícia e Rafa por toda a contribuição e colaboração no meu projeto, ajuda e amizade quando mais precisei e por tornarem as horas de laboratório mais alegres.

A Monique por toda amizade.

As colegas da NucBio – Bruna, Taciana, Taís, Larissa Nahyara, Thamirys, Verônica, Grasi e Nathália - que contribuíram direta ou indiretamente.

A FEQUI pela oportunidade e infraestrutura.

A Cecília por todo apoio, incentivo e profissionalismo do primeiro ao último dia, meus sinceros agradecimentos.

A CAPES pelo apoio financeiro.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.  
(Simone de Beauvoir)

---

## SUMÁRIO

---

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	v
RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
1 - INTRODUÇÃO .....	1
1.1 - Objetivos.....	3
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1 - Soja.....	4
2.2 - Melaço de soja .....	6
2.3 - Surfactantes .....	8
2.4 - Biossurfactantes.....	10
2.4.1 - Glicolípídeos .....	11
2.4.2 - Ácidos Graxos, Fosfolípídeos e Lipídeos neutros .....	13
2.4.3 - Lipopeptídeos.....	14
2.4.4 - Biossurfactantes poliméricos .....	14
2.4.5 - Produção de Biossurfactantes .....	14
3 - MATERIAL E MÉTODOS .....	17
3.1 - Microrganismo .....	17
3.2 – Fonte de carbono.....	17
3.3 – Determinação de gordura.....	17
3.4 – Meio de manutenção da cultura .....	17
3.5 - Testes Preliminares.....	18
3.5.1- Avaliação da linhagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> empregada, da quantidade de microrganismo e da concentração de melaço.....	18
3.5.2 - Experimento com preparação de inóculo e adição de nitrato de amônio .....	19
3.6 – Produção do Biossurfactante.....	20
3.7 - Planejamento Composto Central .....	21
3.8 - Procedimentos analíticos .....	23
3.8.1 - Tensão Superficial .....	23
3.8.2 - Índice de Emulsificação.....	23
3.8.3 - Biomassa.....	24



3.8.4 - Concentração de Raminose.....	24
3.8.5 - Concentração de Biossurfactante.....	25
3.9 - Avaliação do biossurfactante.....	25
3.9.1 - Quantificação de açúcar.....	25
3.9.2 - Extração de gordura por Soxhlet.....	25
3.9.3 - Teor de carbono e nitrogênio.....	26
3.9.4 – Concentração micelar crítica (CMC).....	26
3.9.5 – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.....	26
3.10 – Teste em reator.....	27
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 – Determinação de gordura.....	28
4.2 – Testes Preliminares.....	28
4.2.1 Experimentos com preparação de Inóculo e adição de Nitrato de Amônio.....	39
4.3 – Planejamento composto central.....	42
4.3.1 - Tensão Superficial.....	43
4.3.2 - Índice de emulsificação.....	48
4.3.3 - Concentração de Raminose.....	52
4.3.4 - Concentração de Biossurfactantes.....	56
4.4 – Validação do modelo.....	60
4.4.1 – Quantificação de açúcar.....	61
4.4.2 – Extração de gordura por Soxhlet.....	62
4.4.3 – Teor de carbono e nitrogênio.....	62
4.4.4 – Concentração micelar crítica (CMC).....	63
4.4.5 – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.....	64
4.5 – Teste em reator.....	65
5 - CONCLUSÃO.....	67
5.1 - Conclusão.....	67
5.2 - Sugestões para trabalhos futuros.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
ANEXO.....	74

---

---

## LISTA DE FIGURAS

---

---

Figura 2.1 - Fluxograma da distribuição em massa do processamento de soja (adaptado de SIQUEIRA, 2007). .....	7
Figura 2.2 - Comportamento da concentração micelar crítica (CMC) de um surfactante (adaptado de PLOCINICZAK <i>et al.</i> , 2011).....	9
Figura 2.3 - Estrutura molecular do mono-raminolipídeo (a) e do di-raminolipídeo (b) (BANAT, 2010).....	12
Figura 3.1 – Fluxograma dos testes preliminares.....	19
Figura 3.2 – Fluxograma do procedimento experimental.....	21
Figura 4.1 - Tensão superficial e biomassa ao longo do tempo para melação de soja 250 g/L, pH 7,0 e 0,1 g/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027.....	28
Figura 4.2 - Análises de tensão superficial, biomassa e concentração de biossurfactante em função do tempo para meio fermentativo com 100 g/L de melação de soja, pH ajustado para 7,0, sem inóculo e 0,3 g/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027. ....	29
Figura 4.3 - Biomassa (BM) ao longo do tempo para as condições de 100 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027; 100 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027; 250 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027 e 250 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027.....	30
Figura 4.4 - Concentração de biossurfactante (CB) ao longo do tempo para as condições de 100 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027; 100 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027; 250 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027 e 250 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027.....	31
Figura 4.5 - Índice de emulsificação (IE) ao longo do tempo para as condições de 100 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027; 100 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027; 250 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027 e 250 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027.....	32
Figura 4.6 - Tensão superficial (TS) ao longo do tempo para as condições de 100 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027; 100 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027; 250 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027 e 250 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027.....	32
Figura 4.7 - Biomassa (BM) ao longo do tempo para as condições 100 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 10145; 100 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 10145; 250 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de	

*Pseudomonas aeruginosa* 10145 e 250 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145..... 33

Figura 4.8 - Concentração de biossurfactante (CB) ao longo do tempo para as condições 100 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145; 100 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145; 250 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145 e 250 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145..... 34

Figura 4.9 - Índice de emulsificação (IE) ao longo do tempo para as condições 100 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145; 100 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145; 250 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145 e 250 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145..... 35

Figura 4.10 - Tensão superficial (TS) ao longo do tempo para as condições 100 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145; 100 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145; 250 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L e *Pseudomonas aeruginosa* 10145 e 250 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145..... 35

Figura 4.11 - Biomassa ao longo do tempo para os testes preliminares T5 em pH 5,8 e T6 em pH 7,0 para as concentrações de 50 g/L e 100 g/L de melação de soja no meio e cada uma com 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145..... 36

Figura 4.12 - Concentração de biossurfactante ao longo do tempo para os testes preliminares T5 em pH 5,8 e T6 em pH 7,0 para as concentrações de 50 g/L e 100 g/L de melação de soja no meio e cada uma com 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145..... 37

Figura 4.13 - Índice de emulsificação ao longo para os testes preliminares T5 em pH 5,8 e T6 em pH 7,0 para as concentrações de 50 g/L e 100 g/L de melação de soja no meio e cada uma com 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145..... 37

Figura 4.14 - Tensão superficial ao longo do tempo para os testes preliminares T5 em pH 5,8 e T6 em pH 7,0 para as concentrações de 50 g/L e 100 g/L de melação de soja no meio e cada uma com 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145..... 38

Figura 4.15 – Biomassa (BM) e concentração de biossurfactante (CB) ao longo do tempo para *Pseudomonas aeruginosa* proveniente de *Landfarming*, pH 7,0, fermentação direta, concentração de 50 g/L e 100 g/L de melação de soja e 1,0 g/L de microrganismos. .... 38

Figura 4.16 - Tensão superficial (TS) e índice de emulsificação (IE) ao longo do tempo para *Pseudomonas aeruginosa* proveniente de *Landfarming*, pH 7,0, fermentação direta, concentração de 50 g/L e 100 g/L de melação de soja e 1,0 g/L de microrganismos. .... 39

Figura 4.17 - Biomassa ao longo do tempo para os experimentos com inóculo preparado por 24 horas com *Pseudomonas aeruginosa* 10145 e adição de 30 mL em cada Erlenmeyer contendo 120 mL do respectivo meio, concentrações de 50 g/L e 100 g/L, pH 7,0, experimento 9 com adição de nitrato. .... 40

Figura 4.18 - Concentração de biossurfactante ao longo do tempo para os experimentos com inóculo preparado por 24 horas com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 10145 e adição de 30 mL em cada Erlenmeyer contendo 120 mL do respectivo meio, concentrações de 50 g/L e 100 g/L, pH 7,0, experimento 9 com adição de nitrato.....	41
Figura 4.19 - Índice de emulsificação ao longo do tempo para os experimentos com inóculo preparado por 24 horas com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 10145 e adição de 30 mL em cada Erlenmeyer contendo 120 mL do respectivo meio, concentrações de 50 g/L e 100 g/L, pH 7,0, experimento 9 com adição de nitrato.....	41
Figura 4.20 - Tensão superficial ao longo do tempo para os experimentos com inóculo preparado por 24 horas com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 10145 e adição de 30 mL em cada Erlenmeyer contendo 120 mL do respectivo meio, concentrações de 50 g/L e 100 g/L, pH 7,0, experimento 9 com adição de nitrato.....	42
Figura 4.21 - Diagrama de Pareto em relação às variáveis estudadas para a tensão superficial. ....	44
Figura 4.22 - Distribuição dos resíduos relativos à tensão superficial. ....	45
Figura 4.23 - Valores preditos em função dos valores observados relativos à tensão superficial. ....	46
Figura 4.24 - Superfície de resposta para a tensão superficial em relação às variáveis estudadas. ....	47
Figura 4.25 - Curvas de contorno para a tensão superficial em relação às variáveis estudadas. ....	47
Figura 4.26 - Diagrama de Pareto em relação às variáveis estudadas para o índice de emulsificação.....	48
Figura 4.27 - Distribuição dos resíduos relativos ao índice de emulsificação. ....	49
Figura 4.28 - Valores preditos em função dos valores observados relativos ao índice de emulsificação.....	50
Figura 4.29 - Superfície de resposta para o índice de emulsificação em relação às variáveis estudadas.....	51
Figura 4.30 - Curvas de contorno para o índice de emulsificação em relação às variáveis estudadas.....	51
Figura 4.31 - Diagrama de Pareto em relação às variáveis estudadas para a concentração de raminose. ....	52
Figura 4.32 - Distribuição dos resíduos relativos à concentração de raminose.....	53
Figura 4.33 - Valores preditos em função dos valores observados relativos à concentração de raminose. ....	54

Figura 4.34 - Superfície de resposta para a concentração de raminose em relação às variáveis estudadas.....	55
Figura 4.35 - Curvas de contorno para a concentração de raminose em relação às variáveis estudadas.....	55
Figura 4.36 - Diagrama de Pareto em relação às variáveis estudadas para a concentração de biossurfactante.....	56
Figura 4.37 - Distribuição dos resíduos relativos à concentração de biossurfactante. ....	57
Figura 4.38 - Valores preditos em função dos valores observados relativos à concentração de biossurfactante.....	58
Figura 4.39 - Superfície de resposta para a concentração de biossurfactante em relação às variáveis estudadas. ....	59
Figura 4.40 - Curvas de contorno para a concentração de biossurfactante em relação às variáveis estudadas.....	59
Figura 4.41 – Cinética das respostas estudadas ao longo do tempo de fermentação. ....	61
Figura 4.42 - Concentração de açúcares ao longo do tempo do experimento de validação em 48 horas de produção.....	62
Figura 4.43 – Análise do consumo de carbono total e nitrogênio total do experimento de validação em 48 horas de produção.....	63
Figura 4.44 – Concentração micelar crítica do experimento de validação em 48 horas de produção. ....	64
Figura 4.45 – Espectroscopia do Infravermelho para o biossurfactante produzido em 48 horas. ....	65
Figura 4.46 – Biomassa e concentração de biossurfactante ao longo do tempo para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 10145, pH 7,0, reator com agitação de 310 rpm e aeração de 1,2 vvm, concentração de 120 g/L de melão de soja e 4,0 g/L de microrganismos. ....	66
Figura 4.47 - Tensão superficial e índice de emulsificação ao longo do tempo para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 10145, pH 7,0, reator com agitação de 310 rpm e aeração de 1,2 vvm, concentração de 120 g/L de melão de soja e 4,0 g/L de microrganismo.....	66

---

---

## LISTA DE TABELAS

---

---

Tabela 2.1 - Composição do melaço de soja em base seca (adaptado de SIQUEIRA, 2007)....	7
Tabela 2.2 - Tipos de biossurfactantes e microrganismos (adaptado de PLOCINICZAK <i>et al.</i> , 2011).....	11
Tabela 3.1 - Composição do meio gelose.....	18
Tabela 3.2 - Valores reais e codificados de cada variável.....	22
Tabela 3.3 - Matriz do planejamento composto central .....	23
Tabela 4.1 - Planejamento composto central com as variáveis estudadas e as respostas analisadas.....	43
Tabela 4.2 - Valores encontrados para as faixas que otimizam as respostas.....	60
Tabela 4.3 - Dados obtidos pelo experimento de validação do modelo .....	60

---

## RESUMO

---

Os biossurfactantes tem ganhado destaque nos últimos anos em relação aos surfactantes químicos devido às suas vantagens em termos ambientais e toxicidade. A biodegradabilidade e o uso de coprodutos agroindustriais para sua produção são alguns dos seus principais benefícios. O melaço de soja é um coproduto gerado durante o processamento da soja que possui alta produção e baixo valor comercial. Seu uso tem grande potencial em processos fermentativos devido à alta concentração de carboidratos, lipídeos e proteínas. O presente trabalho estudou a utilização de *Pseudomonas aeruginosa* para produzir biossurfactantes em um meio fermentativo de melaço de soja. Foram realizados testes preliminares para determinar as melhores condições de produção. Nestes testes as culturas bacterianas analisadas foram: *Pseudomonas aeruginosa* 9027, *Pseudomonas aeruginosa* 10145 e *Pseudomonas aeruginosa* proveniente de *Landfarming*. Dentre elas, a que apresentou melhores resultados foi a *Pseudomonas aeruginosa* 10145. Em relação ao meio fermentativo de melaço de soja foram testadas três concentrações (50, 100 e 250 g/L) sendo que, para os fatores que mais influenciaram na avaliação da eficiência de um surfactante (índices de emulsificação e de tensão superficial), os melhores resultados foram obtidos para as concentrações de 50 e 100 g/L. O pH do meio foi ajustado para 7,0. Após a determinação das melhores condições foi elaborado um planejamento composto central (PCC) com duas variáveis e três réplicas no ponto central para otimizar a produção de biossurfactantes. A variável concentração inicial de melaço de soja teve como faixa os valores entre 29,3 e 170,7 g/L e a concentração inicial de microrganismo variou entre 0,2 e 5,8 g/L. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, em uma mesa agitadora a  $30,0 \pm 1,0$  °C e 120 rpm, por 72 horas com amostras coletadas a cada 12 horas. Desta forma, para validar os experimentos foram utilizados os valores de 120 g/L para a concentração de melaço de soja e de 4 g/L para a concentração inicial de microrganismo. Como resposta foram obtidos os seguintes valores para 48 horas de fermentação: tensão superficial de 31,9 mN/m, índice de emulsificação de 97,4%, biomassa de 11,5 g/L, concentração de raminose de 6,8 g/L e concentração de biossurfactante de 11,7 g/L. Foi realizada ainda a análise de concentração micelar crítica (CMC) que obteve um valor de aproximadamente 80 mg/L. Os resultados obtidos apontam potencial da produção de biossurfactante utilizando como substrato o melaço de soja e bactérias do gênero *Pseudomonas aeruginosa*.

Palavras-chave: biossurfactante, melaço de soja, *Pseudomonas aeruginosa*.

---

---

## ABSTRACT

---

---

Biosurfactants has excelled in the past years when compared to chemical surfactants due to its advantages related to environmental and toxicity. Some of the benefits of the biosurfactants is that it can be produced from agroindustrial product co and is biodegradable. The soy molasses is a product co generated during soybean processing that has high production and low commercial value. Its use has great potential in fermentative processes due to the high concentration of carbohydrates, lipids and proteins. This study investigated the use of *Pseudomonas aeruginosa* to produce biosurfactants in a soy molasses-based fermentation medium. Preliminary tests were performed to determine the best conditions of production. In these tests the bacterial cultures analyzed were: *Pseudomonas aeruginosa* 9027, *Pseudomonas aeruginosa* 10145 and *Pseudomonas aeruginosa* from *Landfarming*. Among them, with the best results was *Pseudomonas aeruginosa* 10145. In relation to the soy molasses-based fermentation medium three concentrations were tested (50,100 and 250 g/L) and for the factors that influences the most on the evaluation of the efficiency of a surfactant (emulsifying and surface tension index) the best results were obtained for the concentrations of 50 and 100 g/L. In addition, the pH was adjusted to 7.0. After determining the best conditions it was developed a Central Composite Design (CCD) with two variables and three replicates at the central point to optimize the production of biosurfactant. The concentration of soy molasses has values between 29.3 and 170.7 g/L and the initial concentration of microorganism varies between 0.2 and 5.8 g/L. All the experiments were performed in duplicate on a shaker table to  $30.0 \pm 1.0$  °C and 120 rpm during 72 hours with samples taken every 12 hours. Thus, to validate the experiments were used the values of 120 g/L for the initial concentration of soy molasses and 4 g/L for the initial concentration of microorganisms. In response the following values were obtained at 48 hours of fermentation: surface tension of 31.9 mN/m, emulsification rate of 97.4%, biomass concentration of 11.5 g/L, rhamnase concentration of 6.9 g/L and concentration of biosurfactant of 11.7 g/L. Further analysis was carried out for critical micelle concentration (CMC) in which it was obtained approximately 80 mg/L. These values show a great potential for biosurfactant production using soybean molasses as substrate and the bacteria of the genus *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: biosurfactant, soybean molasses, *Pseudomonas aeruginosa*.



---

## 1 - INTRODUÇÃO

---

Os surfactantes, ou tensoativos, representam uma classe de compostos químicos que possui grande importância no cenário mundial das indústrias químicas. O emprego dos surfactantes é amplamente diversificado e utilizado nas mais diversas indústrias, tais como as têxteis, agropecuárias e petrolíferas. O ápice de sua produção ocorreu na década de 80 e atualmente corresponde a uma grande parcela da receita bruta de produtos químicos. No ano de 2012 o mercado mundial de surfactantes movimentou cerca de 26,9 bilhões de dólares, o Brasil foi responsável por 1,5 bilhões desse montante no mesmo ano (GREEK, 1990; BANAT *et al.*, 2000; BNDES, 2014).

Os surfactantes são substâncias anfifílicas, possuem uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica. São classificados em quatro grupos, de acordo com a carga iônica da parte polar da molécula, aniônicas, não iônicas, anfóteras e catiônicas. Apresentam como características principais a redução da tensão superficial e interfacial, ação emulsificante, solubilizante e formação de micelas. Um dos índices mais utilizados para determinar a eficiência de um surfactante é a concentração micelar crítica, que é a concentração mínima de surfactante necessária para atingir a menor tensão superficial ou interfacial de uma fase aquosa (BANAT *et al.*, 2000; DESAI e BANAT, 1997; MULLIGAN, 2005).

Apesar de se caracterizarem como um dos produtos químicos mais versáteis, os surfactantes possuem, em sua maioria, composição a base de derivados do petróleo, tornando-os produtos tóxicos e não biodegradáveis (NISTCHKE e PASTORE, 2002). No setor industrial nos últimos anos, a questão ambiental tornou-se um aspecto imprescindível e como forma alternativa ao uso dos surfactantes, recentes estudos apontam grande potencial para o uso dos biossurfactantes.

Os biossurfactantes são surfactantes sintetizados pelo crescimento aeróbio de microrganismos, que podem ser bactérias, fungos filamentosos ou leveduras em diferentes fontes de carbono. Apresentam características semelhantes às dos surfactantes sintetizados quimicamente, porém destacam-se diversas vantagens como alta tolerância às mudanças extremas de pH e temperatura, possuem baixa toxicidade, apresentam ampla diversidade de estruturas químicas e são biodegradáveis (BOGNOLO, 1999; NISTCHKE e PASTORE, 2002; MULLIGAN, 2005).

De forma distinta aos surfactantes, os biossurfactantes são classificados de acordo com sua estrutura química e origem microbiana. Os principais grupos são: glicolipídeos,

## ***INTRODUÇÃO***

---

lipopetídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros, biossurfactantes poliméricos e surfactantes particulados (LANG, 2002).

Os raminolipídeos são biossurfactantes do grupo dos glicolipídeos e produzidos por bactérias do tipo *Pseudomonas aeruginosa*, formados através da ligação de uma molécula de raminose a uma ou duas moléculas de ácido  $\beta$ -hidroxidecanóico. Essa é uma classe de biossurfactante bastante atrativa, apresenta capacidade para reduzir a tensão superficial, emulsionar hidrocarbonetos e pode ser produzida em meios de cultivo com hidrocarbonetos ou carboidratos como única fonte de carbono (ROSEMBERG e RON, 1999; HOLMBERG, 2001).

Apesar de todas as vantagens que os biossurfactantes apresentam, o elevado custo de sua produção acaba tornando um empecilho para utilização em escala industrial. Para reduzir esse custo, uma alternativa é a utilização de resíduos agroindustriais como substrato para produção dos biossurfactantes (BANAT *et al.*, 2000; MESQUITA, 2004).

Dentre as agroindústrias, a soja possui grande destaque em todo o mundo, a demanda de produtos provenientes da soja como o farelo e o óleo cresceu em proporções mundiais. O Brasil destaca-se como o principal exportador de soja e o segundo maior produtor, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, tornando a soja um agronegócio de fundamental importância na economia brasileira (EMBRAPA, 2015; KAMALI *et al.*, 2016). A soja é uma importante fonte de alimentação tanto animal quanto humana devido ao alto valor nutricional das frações proteicas e lipídicas. O grão possui ainda, elevado teor de carboidratos, presentes em sua grande maioria, na forma de celulose e açúcar, além de possuir uma fração importante de compostos nitrogenados (SMITH e CIRCLE, 1975).

O processamento da soja ocorre em diversas etapas e um dos produtos desejados é o concentrado proteico de soja. Concomitante a esta etapa ocorre a produção do melaço de soja, rico em carboidratos e produzido a partir da extração alcoólica dos açúcares presentes no farelo desengordurado (JOHNSON *et al.*, 1992). O melaço é um coproduto agroindustrial de alta geração e baixo custo comercial seu descarte incorreto pode acarretar diversos problemas ambientais e seu uso é proposto de diversas maneiras a fim de minimizar este problema, um deles é o uso em processos fermentativos por sua elevada concentração de açúcares (QURESHI *et al.* 2001; SIQUEIRA, 2007).

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho são apresentados a seguir.

## ***INTRODUÇÃO***

---

### **1.1 - Objetivos**

O objetivo geral deste trabalho consiste em produzir biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* a partir da utilização do coproduto agroindustrial proveniente do processamento de soja denominado melaço de soja.

Como objetivos específicos, seguem:

- Otimizar a produção de biossurfactantes quanto às concentrações iniciais de melaço de soja e de microrganismo;
- Caracterizar o biossurfactante quanto à concentração de raminose, índice de emulsificação, tensão superficial, concentração de biossurfactante e concentração micelar crítica;
- Comparar a produção de biossurfactantes com os valores obtidos pela literatura.

---

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1 - Soja

*Glycine max (L.)* é o nome científico da soja. Pertencente à classe das dicotiledôneas e à família das leguminosas, a oleaginosa é originária da costa leste da Ásia onde é cultivada há milhares de anos. Era considerada um grão sagrado, resultado de cruzamento natural de duas espécies de soja selvagens, que foram domesticadas e melhoradas geneticamente por cientistas chineses (RIVAS, 2006).

Embora seja cultivada há mais de 5.000 anos no Oriente, o primeiro registro de cultivo no Brasil aconteceu em 1914 no município de Santa Rosa, RS. Porém, somente a partir da década de 60, incentivada pela política de subsídios ao trigo que a soja se estabeleceu como cultura economicamente viável. Dez anos mais tarde, a cultura de soja passou a ser a principal do agronegócio brasileiro (EMBRAPA, 2015).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2016) atualmente o Brasil está entre os líderes mundiais na produção e exportação dentre vários produtos agropecuários. Sendo a soja o maior destaque, nas últimas três décadas foi a cultura agrícola que mais cresceu e, corresponde a 49% de toda a área plantada de grãos.

Dados da Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE) apontam que no primeiro trimestre do ano de 2016 foram exportados 10,8 milhões de toneladas de soja em grão, 3,5 milhões de toneladas de farelo e 249 mil toneladas de óleo. Somadas, as três variações representaram 12,6% em receita do total exportado pelo país no mesmo período.

A soja é um alimento rico em proteínas e a composição do seu grão é composta, basicamente, em cerca de 20% de óleo, 35% de carboidrato, 40% de proteína e o restante compreende minerais, tais como magnésio, fósforo, ferro e cobre. Da parte oleosa da soja, os lipídios estão presentes em grande proporção na forma de glicerídeos, fosfatídeos e matéria não saponificável. Possuem baixa solubilidade em solventes apolares e em água e alta em solventes polares (SGARBIERI, 1996).

A grande quantidade de açúcar presente é a principal responsável pela fração de carboidratos na soja, desta 50% é composta por sacarose e a outra metade basicamente de rafinose e estaquiose. Outros açúcares como glicose, frutose, melibiose, galactose, raminose, pinitol, verbascose e maltopentoses representam menos de 1% do total. Além dos açúcares há também celulose e seus derivados que representam cerca de 64% da casca do grão de soja e amido que se encontra em pequena quantidade. A sacarose é um dos principais açúcares

## ***REVISÃO BIBLIOGRÁFICA***

---

presentes, este açúcar pode ser considerado um dissacarídeo não redutor, facilmente hidrolisado em glicose e frutose. A rafinose, também conhecida como galactosilsacarose, é um oligossacarídeo não redutor e não é hidrolisado por humanos e animais monogástricos o que pode ocasionar desconfortos intestinais e produção de gases por não possuírem as enzimas galactosidases responsáveis pela quebra deste açúcar. A hidrólise total resulta em frutose, glicose, e galactose. Por fim, a estaquiose que é um tetrassacarídeo não redutor, apresenta os mesmos problemas que a rafinose para digestão humana e na germinação em brotos de soja (MARKLEY, 1974; SMITH e CIRCLE, 1975; QURESHI *et al.*, 2001; STRÖHER, 2010).

A utilização da soja como alimentação humana e/ou animal encontra-se principalmente na forma de farelo concentrado. O uso como óleo é em menor escala, porém de grande importância no ramo alimentício. Na alimentação a soja possui destaque devido à grande quantidade de proteína presente nos grãos, enfoque é dado também a presença de flavonoides que contribuem no combate e prevenção de doenças cardiovasculares e cancerígenas (MANTOVANI, 2013).

Por apresentar alto teor de umidade, carboidratos, lipídeos e fibra a composição química dos grãos de soja pode variar, bem como ocorrer mudanças químicas, físicas e biológicas dependendo do tempo e condições de cultivo, o período de plantação - devido as condições climáticas - e condições de armazenamento e transporte. O armazenamento da soja é uma etapa delicada e necessária, após a colheita o produto deve ser armazenado até seu processamento e deve-se levar em consideração as condições de estocagem dos grãos, como umidade, temperatura e exposição à luz solar (HOU e CHANG, 1998).

O processamento da soja ocorre em diversas etapas, primeiramente a soja é separada de acordo com o grau de impureza e umidade. Após a separação a soja é limpa em um processo que une ação mecânica e pneumática, onde ocorre a separação da soja limpa de impurezas finas e graúdas. Com os grãos limpos, a casca é retirada com eficiência de até 80% durante a quebra dos grãos e as cascas mais leves são aspiradas. Com a umidade ajustada a no máximo 10% a soja continua a ser quebrada, podendo o grão ser dividido em até 12 partes a fim de aumentar sua superfície de contato. A soja então é cozida em vapor direto por até 30 minutos e temperatura entre 60 e 70 °C, posteriormente é laminada com espessura média entre 0,25 e 0,30 mm, compactada a pressões de 80 a 100 kgf/cm<sup>2</sup>, a fim de promover melhor remoção do óleo presente e por fim é resfriada (BARTOLOMAI, 1987; FERNANDES JR, 2009).

A segunda etapa consiste no processo de extração do óleo presente na massa previamente preparada, para tal é utilizado hexano como solvente a 60 °C. Ao entrar em contato

com a massa ocorre a mistura do solvente com o óleo, conhecida como micela, que é separada da parte sólida através de um extrator e levada a um tanque onde será realizada a separação do óleo e do solvente através de colunas de destilação. O óleo pode ser refinado, resultando em óleo vegetal e este pode ser hidrogenado (FERNANDES JR, 2009).

A etapa de extração da parte sólida, que consiste no farelo desengordurado, é aquecida onde o solvente evapora e o farelo recebe tratamento de calor e umidade. Nesta parte, ocorre o aprimoramento do valor nutritivo do farelo que possibilita a digestão por animais, pois ocorre inibição das enzimas. Para que ocorra a remoção de fosfatídeos (lectinas) pode se usar água na fase oleosa, resultando em uma goma insolúvel na fase oleosa e extraída por centrifugação ou extração alcoólica que é a adição de etanol na proporção de 60 a 70%. São então produzidas a partir da massa a proteína texturizada, isolada ou concentrada. A proteína texturizada é adquirida após a extrusão do farelo desengordurado. Para a proteína isolada, o farelo é dissolvido em pH básico, filtrado ou centrifugado e resuspenso em meio ácido de pH 4,5, desta forma ocorre a precipitação da proteína. A proteína concentrada ou concentrado proteico é obtido pela lavagem do farelo desengordurado com ácidos de pH a 4,5. O concentrado é separado da solução por filtração ou centrifugação e seco. A parte líquida que consiste no soro ácido e os açúcares extraídos do farelo de soja é conhecida como melação de soja (POTTER e HOTCHIKISS, 1997).

### **2.2 - Melação de soja**

O melação de soja é um coproduto do processamento da soja, produzido concomitante ao concentrado proteico. O processo consiste na diluição do farelo desengordurado por extração alcoólica (60%), são separadas duas frações: a primeira é um concentrado alcoólico insolúvel e rico em proteína (70%) e a outra fração é líquida contendo principalmente açúcares. A segunda fração é destilada para recuperação do solvente e obtém o concentrado de açúcares. O melação de soja, que é um líquido viscoso, de cor marrom escura, pH próximo a 5,0 e rico em carboidratos. Produzido em grande escala e de baixo valor comercial (JOHNSON *et al.* 1992). Segundo Siqueira (2007) são produzidos 156,7 kg de melação para cada tonelada de soja processada. A Figura 2.1 mostra a distribuição de massa no processamento da soja.

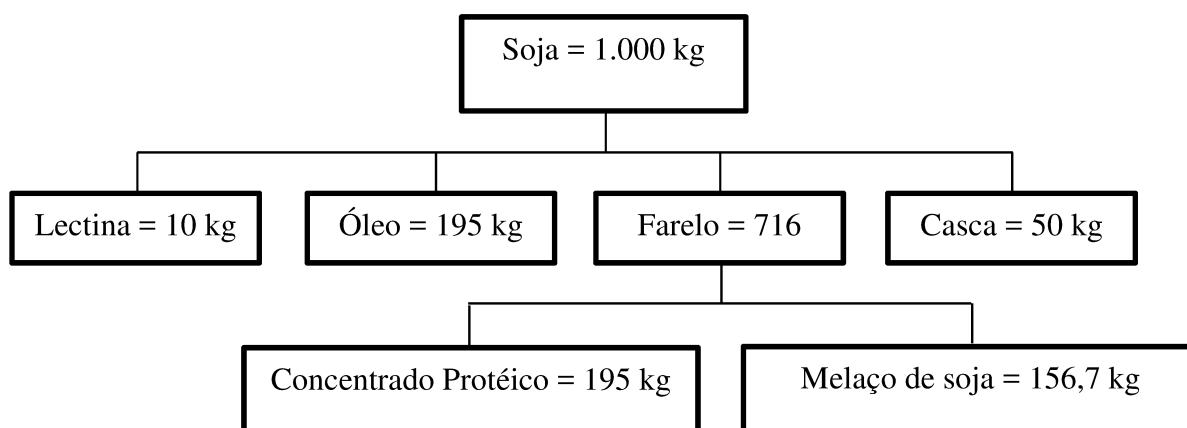


Figura 2.1 - Fluxograma da distribuição em massa do processamento de soja (adaptado de SIQUEIRA, 2007).

O melaço apresenta cerca de 60% de carboidratos ao considerar o total de sólidos suspensos presentes. Pode-se considerar os açúcares presentes como responsáveis por tal porcentagem. Destes açúcares, 58% são digeríveis (sacarose, glicose, frutose e galactose) e os 42% são formados por açúcares não digeríveis (rafinose, estaquiose e verbascose) por humanos e/ou animais (QURESHI *et al.*, 2001; CHAJUSS, 2004). A Tabela 2.1 apresenta a composição em base seca da amostra de melaço de soja analisada por Siqueira (2007).

Tabela 2.1 - Composição do melaço de soja em base seca (adaptado de SIQUEIRA, 2007)

Componente	% em base seca
Carboidratos Totais	57,3
Glicose	0,243
Frutose	0,127
Galactose	0,254
Sacarose	28,4
Lactose	-
Rafinose	9,68
Estaquiose	18,6
Proteínas	9,44
Lipídeos	21,2
Fibras	5,7
Cinzas	6,36

### 2.3 - Surfactantes

Os surfactantes, também conhecidos como tensoativos, constituem uma importante classe de compostos químicos utilizados amplamente na indústria química tendo seu uso em detergência, emulsificação, dispersão de fases, solubilização, lubrificação, agentes molhantes e espumantes (BANAT, 2000).

Os surfactantes são compostos formados por moléculas anfipáticas que apresentam uma porção hidrofílica (polar) que possui afinidade com água e outra hidrofóbica (apolar) que possui afinidade com óleos e não com água. A parte polar pode ser subdividida e classificada em quatro subsegmentos: aniônicos, não-iônicos, catiônicos e anfóteros, já a parte apolar geralmente é formada por hidrocarbonetos lineares ou ramificados. Por possuírem os dois grupos presentes em uma mesma molécula, os surfactantes tendem a se disseminar na interface entre fases fluidas com distintos graus de polaridade e ligações de hidrogênio, tal como os sistemas bifásicos óleo/água e ar/água. Desta forma, os surfactantes possuem a capacidade de reduzir as tensões interfacial e superficial, através da formação de um filme molecular entre duas fases não miscíveis, além de formarem microemulsões de hidrocarbonetos capazes de se solubilizar em água (DESAI e BANAT, 1997; NISTCHKE e PASTORE, 2002; MULLIGAN, 2005).

Uma das propriedades mais versáteis dos surfactantes é a emulsificação entre duas fases líquidas imiscíveis e consiste na dispersão de um líquido em outro, ocorrendo formação de gotas cujo menor diâmetro aponta maior estabilidade da emulsificação, o diâmetro pode variar entre 0,1 e 100 nm (ZAJIC e SEFFENS, 1984). Em termos gerais, a emulsão ocorre em duas fases, uma é aquosa e a outra um líquido oleoso, dessas podem ocorrer dois tipos de emulsão. A primeira é chamada de emulsão de óleo em água, quando o óleo é a fase dispersa e a segunda, emulsão água em óleo que ocorre quando o meio aquoso é a fase dispersa da emulsão. A emulsificação promove a degradação de hidrocarbonetos em ambientes aquosos por microrganismos, pois ocorre o aumento da área de contato de materiais hidrofóbicos, se tornando uma propriedade de grande importância nos processos de biorremediação (KARANTH, *et al.*, 1999).

A tensão superficial é definida como a medida de energia livre da superfície por unidade de área necessária para deslocar uma molécula do interior de um líquido para sua superfície. Com a variação de temperatura, ocorre também uma variação do valor da tensão superficial, um aumento na temperatura causa aumento da energia cinética das moléculas e redução das forças atrativas intermoleculares. Logo, a tensão superficial decai com o aumento



da temperatura. Ao reduzir a tensão superficial (líquido/ar) e interfacial (líquido/líquido) a força de repulsão entre duas fases diferentes também reduz, permitindo que estas se misturem e interajam mais facilmente. É possível realizar medições das tensões superficial e interfacial de líquidos e soluções aquosas com o auxílio de um tensiômetro. A eficácia de um surfactante pode ser atribuída à redução da tensão superficial, sendo a concentração micelar crítica (CMC) um dos fatores mais utilizados para essa medida. Quanto menor o valor da CMC, mais eficiente é o surfactante (BRADY e HUMISTON, 1981; MULLIGAN, 2005).

A CMC é o efeito de solubilização de um agente surfactante em uma fase aquosa, ou seja, é determinado pela menor concentração de tensoativo necessária para alcançar o menor valor de tensão interfacial e superficial. Por exemplo, a tensão superficial da água destilada pura é de 72 mN/m ao adicionar quantidade suficiente de surfactante esse valor decai para até 30 mN/m. Concentrações acima desse valor crítico causam o início de formação de estruturas supramoleculares como micelas, bicamadas e vesículas. Quando a concentração de surfactante é baixa, ou seja, antes de atingir o ponto crítico da concentração micelar crítica, as moléculas existem na forma de monômeros, quando a concentração do surfactante aumenta, os monômeros vão saturando a interface. Ao adicionar mais moléculas de monômeros, aumenta a interação desfavorável entre a fração apolar e as moléculas de água até o ponto em que os monômeros vão se agregando formando micelas (LIN, 1996). A Figura 2.2 demonstra o comportamento geral da avaliação da concentração micelar crítica de um surfactante.

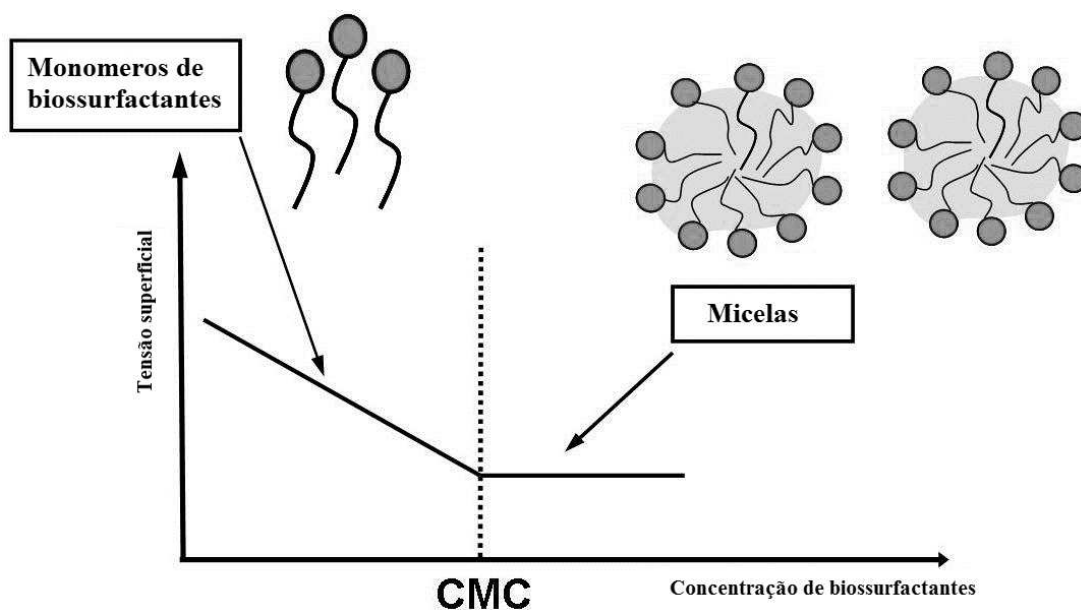


Figura 2.2 - Comportamento da concentração micelar crítica (CMC) de um surfactante (adaptado de PLOCINICZAK *et al.*, 2011).

A maioria dos surfactantes produzidos são oriundos de petróleo, apesar de ser um dos mais versáteis produtos químicos aplicados na indústria, por suas características, os surfactantes são produtos tóxicos e não biodegradáveis (DESAI e BANAT, 1997).

### **2.4 - Biosurfactantes**

Com a crescente preocupação ambiental dos últimos anos, os biosurfactantes surgem como substitutos aos surfactantes. Os biosurfactantes são oriundos do crescimento microbiano aeróbio em meios aquosos a partir de substratos como fonte de carbono. Podem ser sintetizados por bactérias, leveduras e fungos filamentosos (BOGNOLO, 1999). Possuem ainda vantagens em relação ao seu semelhante quimicamente sintetizado, como: alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, capacidade de biorremediação, biocompatibilidade e biodigestibilidade para uso em alimentos, estabilidade a condições extremas de temperatura, salinidade e pH, emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos através da formação de micelas que se acumulam na interface de líquidos de diferentes polaridades. Além de poderem ser produzidos empregando resíduos industriais e outras fontes de carbono de baixo custo (KOSARIC, 2001).

Plociniczak *et al.* (2011) estudaram os avanços nas aplicações dos biosurfactantes, destacando as vantagens em relação aos equivalentes sintetizados quimicamente. Enfatizaram ainda, o uso de estirpes bacterianas a fim de produzir biosurfactantes capazes de aumentar a eficiência da remoção de metais pesados em solos contaminados por fitoremediação. Classificaram os biosurfactantes quanto a sua composição química, propriedades físico-químicas, peso molecular, modo de ação e origem microbiana.

Em relação ao peso molecular os biosurfactantes são classificados em alto e baixo peso molecular, os de baixo peso são eficientes na redução das tensões superficiais e interfaciais, como os glicolipídeos e lipopetídeos, enquanto os de alto peso são eficazes na estabilização das emulsões óleo/água, como os surfactantes poliméricos (MUKHERJEE *et al.*, 2006; PLOCINICZAK *et al.*, 2011). A Tabela 2.2 apresenta a classificação dos biosurfactantes de acordo como o microrganismo utilizado.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 2.2 - Tipos de biossurfactantes e microrganismos (adaptado de PLOCINICZAK *et al.*, 2011)

Biossurfactante		Microrganismo
Grupo	Classe	
Glicolipídeos	Raminolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>
	Trealolipídeos	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Nocardia sp.</i> , <i>Corynebacterium sp.</i>
	Soforolipídeos	<i>Torulopsis bambicola</i> , <i>Torulopsis petrophilum</i> , <i>Torulosis apícola</i>
Ácidos Graxos,	Ácidos Graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Fosfolipídeos,	Fosfolipídeos	<i>Penicillium spiculisporum</i>
Lipídeos Neutros	Lipídeos Neutros	<i>Acinetobacter sp.</i>
Lipopeptídeos	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
	Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
Biossurfactantes Poliméricos	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1
	Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i> KA-53
	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> A2
	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
	Manaproteína	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

### 2.4.1 - Glicolipídeos

Os glicolipídeos representam a maior parte dos biossurfactantes, podem ser encontrados nas formas de mono, di, tri ou tetrassacarídeos e podem incluir moléculas de glicose, galactose, raminose, sulfato de galactose e ácido glucurônico. No grupo dos glicolipídeos pode-se classificar os raminolipídeos e os soforolipídeos como hidróxi-ácidos

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

graxos ou ácidos graxos ligados a uma molécula de açúcar. Já a trealose é um alcil-poliol em que ocorre a ligação de um dissacarídeo com ácidos graxos de cadeia longa (KARANTH *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2007).

Os raminolipídeos produzidos por *Pseudomonas sp.* quando comparado a outros biossurfactantes, tem maior capacidade de produção e maior variedade de utilização, apresentam alta afinidade por moléculas orgânicas hidrofóbicas, menor toxicidade ao ambiente e alta possibilidade de produção a partir de substratos hidrofóbicos e hidrofílicos (DESAI e BANAT, 1997). Consistem de uma ou duas moléculas de raminose (porção hidrofílica) ligadas a uma ou duas cadeias de ácido graxo, com 8-12 átomos de carbono saturados ou insaturados (porção hidrofóbica). Esse tipo de biossurfactante tem sido amplamente estudado, sendo reportado como uma mistura de espécies homólogas, em geral os dois principais são os mono-raminolipídeos (Rha-C10-C10) e di-raminolipídeos (Rha-Rha-C10-C10) (LANG e WAGNER, 1987; SIM *et al.*, 1997; DÉZIEL *et al.*, 1999). A Figura 2.3 apresenta a estrutura do mono-raminolipídeo (RL1) e di-raminolipídeo (RL2).

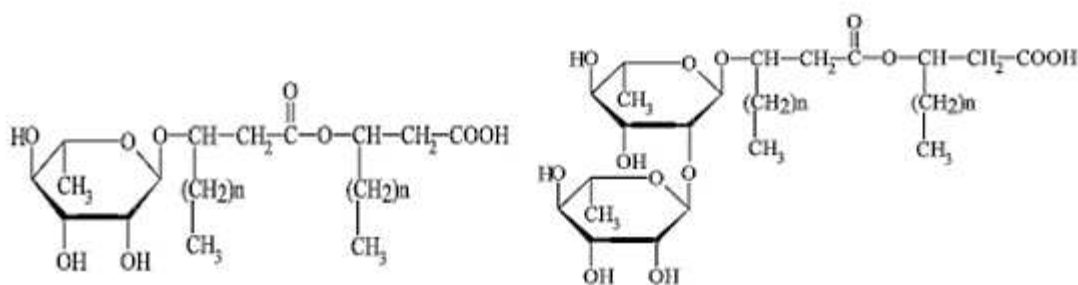


Figura 2.3 - Estrutura molecular do mono-raminolipídeo (a) e do di-raminolipídeo (b) (BANAT, 2010).

O uso dos raminolipídeos em processos de biorremediação e biodegradação tem sido amplamente estudado. Nikolopoulou e Kalogerakis (2008) estudaram o comportamento da biodegradação de derramamento de petróleo em ambientes marinhos com adubação de nitrogênio e fósforo em adição de fertilizantes lipofílicos. Os autores adicionaram raminolipídeos e melão para verificar a eficácia desta combinação e, constataram que a utilização do biossurfactante aumentou a remoção de hidrocarbonetos de petróleo, obtendo 96% de remoção em um período de 18 dias.

Abyaneh e Fazaelpoor (2016) apontaram a viabilidade da utilização de raminolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* na remoção de cromo a partir de soluções aquosas. O

biossurfactante apresentou excelentes resultados quando avaliado sob os efeitos de pH, taxa de fluxo de ar e razões molares de raminolípido/cromo e ferro/cromo sobre o desempenho do sistema de flotação. A remoção de cromo foi superior a 95% com concentração inicial de 40 ppm em apenas 5 minutos.

Os trealolípídeos correspondem a outra classe de biossurfactantes do grupo dos glicolípídeos, são produzidos por uma vasta variedade de actinomicetos, conforme apresentado na tabela anterior. Porém, desses o mais utilizado para produção é *Rhodococcus erythropolis*. Em geral, a estrutura do ácido micólico (ácido  $\beta$ -hidroxicarboxílico), número de carbonos e grau de instauração diferem os trealolípídeos que possuem ésteres de trealose na superfície da célula e são constituídos de 2 moléculas de ácido micólico, de cadeia longa e ramificada, ligadas (ligação ester) aos carbonos 6 e 6' do dissacarídeo (RAPP *et al.*, 1979; DESAI e BANAT, 1997). Recentes estudos apontam a utilização desse tipo de biossurfactante na biomedicina por possuírem propriedades bioquímicas versáteis e baixa toxicidade (KUYUKINA *et al.*, 2015).

Já os soforolípídeos são produzidos por leveduras do tipo *Torulopsis sp.* e consistem de moléculas de dissacarídeo soforose ligadas (por uma ligação  $\beta$ -glycosidic) a uma longa cadeia de ácido graxo hidroxilado. Pode-se destacar dois tipos principais de soforolípídeos os provenientes de ácidos graxos (não lactônicos) e os lactônicos (macrolídios) que possuem um anel macrocíclico ligado à lactose por esterificação intramolecular. O segundo tipo possui maior aceitação comercial por sua atividade biocida e é utilizado na fabricação de desodorantes antibacterianos e produtos anticaspa. Em termos gerais, esse tipo de biossurfactante apresenta propriedades biodegradáveis, não tóxico e grande potencial para formulação de produtos de uso em limpeza (LANG *et al.*, 1989; HU e JU, 2001; FLEURACKERS, 2006). Pekin *et al.* (2005) afirmam que os soforolípídeos apresentam ação desodorante, hidratante, biorremediação de solo e atividade anti-cancerígena com inibição de tumores. Alegam ainda, que o microrganismo *Candida bambicola* pode sintetizar diversos substratos, tais como óleos vegetais, gorduras animais e n-alcenos.

### 2.4.2 - Ácidos Graxos, Fosfolípídeos e Lipídeos neutros

A produção de ácidos graxos resultante da oxidação microbiana de *Corynebacterium lepus* a partir de alcanos tem sido considerada como biossurfactantes. O equilíbrio hidrofílico dos ácidos graxos está correlacionado ao comprimento da cadeia de hidrocarbonetos, que geralmente apresentam grupos OH e redução da tensão superficial e interfacial, mas são melhores na gama de C12-C14. Assim como os lipídeos neutros, a produção envolve seu

## ***REVISÃO BIBLIOGRÁFICA***

---

crescimento microbiano em hidrocarbonetos e ambos são proteínas hidrofóbicas (MAKULA e FINNERTY, 1972; ROSENBERG e RON, 1999).

Os fosfolipídeos são conhecidos por formarem os componentes principais de membranas microbianas. Ao utilizar bactérias ou leveduras, que possuem capacidade de degradar hidrocarbonetos, em substratos de alcano tem-se um aumento da produção de fosfolipídeos e, conseqüentemente aumento das propriedades surfactantes (DESAI e BANAT, 1997).

### *2.4.3 - Lipopeptídeos*

Os lipopeptídeos são os biossurfactantes produzidos a partir da bactéria do gênero *Bacillus* e tem apresentado capacidade de redução da tensão superficial, ação antimicrobiana e outras propriedades tensoativas que despertam o interesse para estudos de sua produção. Neste grupo, dá-se destaque à surfactina produzida pelo *Bacillus subtilis*, que apresentou um dos biossurfactantes mais eficientes já reportados (REIS, 1998; MESQUITA, 2004). A surfactina é um lipopeptídeo cíclico contendo sete aminoácidos ligados a um grupo carboxila e hidroxila de ácido graxo  $\beta$ -hidroxilado. De acordo com Kakinuma *et al.* (1969), o uso de surfactina reduziu a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m com concentrações abaixo de 0,005%.

### *2.4.4 - Biossurfactantes poliméricos*

As classes emulsan, liposan, manaproteína e alasan são as mais estudadas no grupo dos biossurfactantes poliméricos. A principal característica deste grupo é a emulsificação, sendo conhecido também por bioemulsificante, possui alto poder de emulsificação por conta da afinidade das biomoléculas por interfaces óleo/água, garantindo emulsões estáveis em baixas concentrações (KOSARIC *et al.*, 1987; DESAI e BANAT, 1997). Rosenberg *et al.* (1979) relataram o uso de emulsan em sistemas água e óleo e obtiveram eficiente emulsificação com concentrações entre 0,001 e 0,01% do biossurfactante.

### *2.4.5 - Produção de Biossurfactantes*

Os biossurfactantes apresentam vantagens em relação ao surfactante químico, porém sua produção não é muito bem aceita devido ao alto custo de produção em grande escala quando comparada ao surfactante sintetizado quimicamente. Para tal, deve-se atentar ao uso de bactérias super-produtoras, baixo custo de substratos como fonte de carbono para as estirpes microbianas, maior eficiência do desenvolvimento da produção e maximização do processo

## ***REVISÃO BIBLIOGRÁFICA***

---

produtivo, que caracteriza obter a maior concentração de biossurfactantes no menor tempo possível (THAVASI *et al.*, 2008; RAZA *et al.*, 2009).

Para aprimorar a quantidade e qualidade da produção de biossurfactantes alguns fatores devem ser estudados como o tipo de substrato, pH, temperatura e agitação do meio em que esse é produzido. Concentrações de nitrogênio, fósforo, manganês e ferro podem influenciar significativamente nesse processo. Para avaliar a eficiência dos biossurfactantes produzido deve-se observar a redução da tensão superficial e interfacial, emulsificação e a concentração micelar crítica (BANAT, 1995; DESAI e BANAT, 1997). A recuperação dos biossurfactantes após o uso é um fator de alto grau de importância, uma vez que com sua reutilização seu custo pode decair. Desta forma a recuperação depende principalmente da carga iônica, solubilidade em água e localização do biossurfactante no meio, que pode ocorrer intra ou extracelular ou ligado à parede da célula (DESAI e BANAT, 1997). As técnicas mais comuns são a precipitação, extração por solventes e adsorção cromatográfica. Biossurfactantes de baixo peso molecular envolvem dois passos, um de precipitação e outro de extração por solventes orgânicos. Os raminolípídeos podem ser precipitados por acidificação e extração com acetato de etila, os soforolípídeos por extração com n-hexano, os trealolípídeos por mistura de clorofórmio e metanol e os lipopetídeos por metanol. Já os biossurfactantes de alto peso molecular, normalmente são extraídos por precipitação com sulfato de amônio e purificados por diálise (SMITH *et al.*, 2010 - a e b).

A vasta aplicabilidade de biossurfactantes é um ponto favorável à sua produção, seu uso pode ser visto em indústrias de cosméticos, alimentos, farmacêuticas, petrolíferas, minerações, agricultura, têxtil dentre outras e nas mais variadas funções: emulsionantes, dispersantes, solubilizantes, detergentes, agentes molhantes, etc. (BANAT, 2000). Diversos estudos têm sido relatados para produção de biossurfactantes utilizando resíduos e coprodutos industriais.

Lima *et al.* (2007) avaliaram através de um planejamento composto central a produção de biossurfactante utilizando *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de uma lagoa contaminada e óleo de soja residual como fonte de carbono. O experimento foi realizado em reatores de bancada de 500 mL contendo 50 mL do meio mineral, sob agitação de 170 rpm e temperatura de 30 °C por 48 horas. Foram analisadas as variáveis operacionais: óleo de soja residual, nitrato de amônio e levedura de cerveja residual; os melhores resultados encontrados foram para 22,0 g/L, 5,7 g/L e 11,0 g/L, respectivamente. Neste ponto, os valores de raminose foi de 2,2 g/L, tensão superficial de 25,37 mN/m e índice de emulsificação de 100%.

## ***REVISÃO BIBLIOGRÁFICA***

---

Lan *et al.* (2015) analisaram a produção de raminolípido com a utilização de um novo tipo isolado de *Pseudomonas*, chamado SWP-4, e fonte de carbono óleo de cozinha usado. Os autores apresentaram bons resultados com este microrganismo, a produção de raminolípido foi de 13,93 g/L, CMC de 27 mg/L, redução da tensão superficial de 71,8 para 24,1 mN/m e índice de emulsificação em torno de 59%, constatando que é viável a produção de biossurfactante a partir de óleo de cozinha por *Pseudomonas* SWO-4.

Ramírez *et al.* (2015) produziram biossurfactantes utilizando azeite residual de moinho como única fonte de carbono. Compararam o uso do substrato na produção de dois tipos de biossurfactante, para a produção de raminolípidos utilizaram *Pseudomonas aeruginosa* e para a produção de surfactina empregaram *Bacillus subtilis*. Constataram que a produção de raminolípido foi maior nas duas concentrações de substrato utilizada, para 2% de m/v a produção foi de 8,78 mg/L contra 3,12 mg/L. Já com 10% m/v produziu 191,46 mg/L de raminolípido e 0,57 g/L de surfactina.

Deepika *et al.* (2016) estudaram a produção de raminolípido a partir de *Pseudomonas aeruginosa* KVD-HR42 e como fonte de substrato óleo de semente de karanja, uma árvore comumente encontrada na Ásia tropical. Os resultados foram analisados através de abordagens estatísticas e superfícies de respostas, as variáveis estatísticas foram óleo de karanja, nitrato de amônio e pH, cujos valores para a condição ótima foram de 23,85 g/L, 9,17 g/L e 7,8, respectivamente. Obtiveram redução significativa da tensão superficial de 65,23 para 30,14 mN/m, valores de CMC de 100 mg/L, produção de biossurfactante de  $5,90 \pm 2,1$  g/L e índice de emulsificação de 83%, no tempo de 48 horas e temperatura de 37 °C. Apontaram grande potencial para a produção de biossurfactantes.

Ma *et al.* (2016) utilizaram uma estirpe DN1 de *Pseudomonas aeruginosa* coletada de solo contaminado por petróleo para produção de raminolípidos utilizando óleo de palma e nitrato de sódio. Obtiveram concentração de raminolípidos próxima a 26 g/L, CMC de 50 mg/L, índice de emulsificação de 100% e redução da tensão superficial de 45,23 para 25,88 mN/m. Apresentaram ainda 6 homólogos de mono-raminolípidos e 7 de di-raminolípidos. O biossurfactante teve ainda capacidade de degradar 90,52% do petróleo bruto apresentando como grande potencial biorremediação.



---

## 3 - MATERIAL E MÉTODOS

---

### 3.1 - Microrganismo

Avaliaram-se a utilização das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e ATCC 10145, provenientes da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello em Campinas-SP, e a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* proveniente de uma cultura isolada de *Landfarming* (REDUC/PETROBRAS), cedida pela Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, nas fermentações estudadas.

### 3.2 – Fonte de carbono

Para a produção do biossurfactante foi utilizado como substrato o coproduto gerado através do processo de produção do concentrado proteico de soja, denominado melaço de soja, cedido pela empresa de processamento de soja Selecta localizada na cidade de Araguari - MG. A amostra cedida foi armazenada em frascos com capacidade de 2 litros e resfriada em freezer horizontal (Electrolux, modelo H300) com temperatura de  $-5 \pm 1$  °C para a utilização durante a realização dos experimentos.

### 3.3 – Determinação de gordura

A quantidade de lipídeos presente na amostra estudada do substrato foi determinada pelo método de Bligh-Dyer (BLIGH e DYER, 1959). O método detalhado encontra-se no Anexo. Para a medição da umidade relativa do melaço de soja puro, foi realizada a secagem em estufa a 80 °C até obter massa constante.

### 3.4 – Meio de manutenção da cultura

As bactérias foram mantidas em meio gelose em tubos de ensaio de vidro inclinados, com repiques quinzenais. O meio, cuja composição é descrita na Tabela 3.1, foi preparado em tubos de ensaio, esterilizado a 120 °C por 20 minutos e resfriado sob inclinação. Após o repique,

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

---

as bactérias permaneceram incubadas por 48 horas em temperatura ambiente, posteriormente foram refrigeradas a  $7 \pm 1$  °C a fim de reduzir seu metabolismo até eventual utilização. Quando utilizadas com inóculo, as bactérias permaneceram incubadas em meio preparado com as respectivas concentrações de melão de soja por 24 horas, com o objetivo de reativar seu metabolismo.

Tabela 3.1 - Composição do meio gelose

<b>Composição</b>	<b>Concentração [g/L]</b>
Ágar bacteriológico	20,0
Extrato de carne	3,0
Peptona de carne bacteriológica	5,0
Sacarose	20,0

### **3.5 - Testes Preliminares**

Testes preliminares foram realizados para estabelecer: a linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* a ser utilizada, a concentração de melão de soja, a quantidade inicial de microrganismos, a utilização de inóculo para reativar o metabolismo ou a realização de fermentações diretas e a adição de nitrato de amônio para avaliar as melhores condições para otimizar a produção de biossurfactante.

#### ***3.5.1- Avaliação da linhagem de Pseudomonas aeruginosa empregada, da quantidade de microrganismo e da concentração de melão.***

Os testes utilizaram as três diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, três diferentes concentrações de melão de soja: 50 g/L; 100 g/L e 250 g/L, diferentes concentrações (0,1 g/L, 0,3 g/L, 0,6 g/L e 1,0 g/L) iniciais de *Pseudomonas aeruginosa* sem preparação de inóculo, ou seja as *Pseudomonas* eram adicionadas diretamente no meio fermentativo. O pH foi ajustado em 7,0 para todos os experimentos e o tempo de fermentação foi de 72 horas com amostragem em períodos de 12 horas. Os testes foram realizados conforme Figura 3.1, em que os melhores resultados foram reproduzidos com microrganismos diferentes.

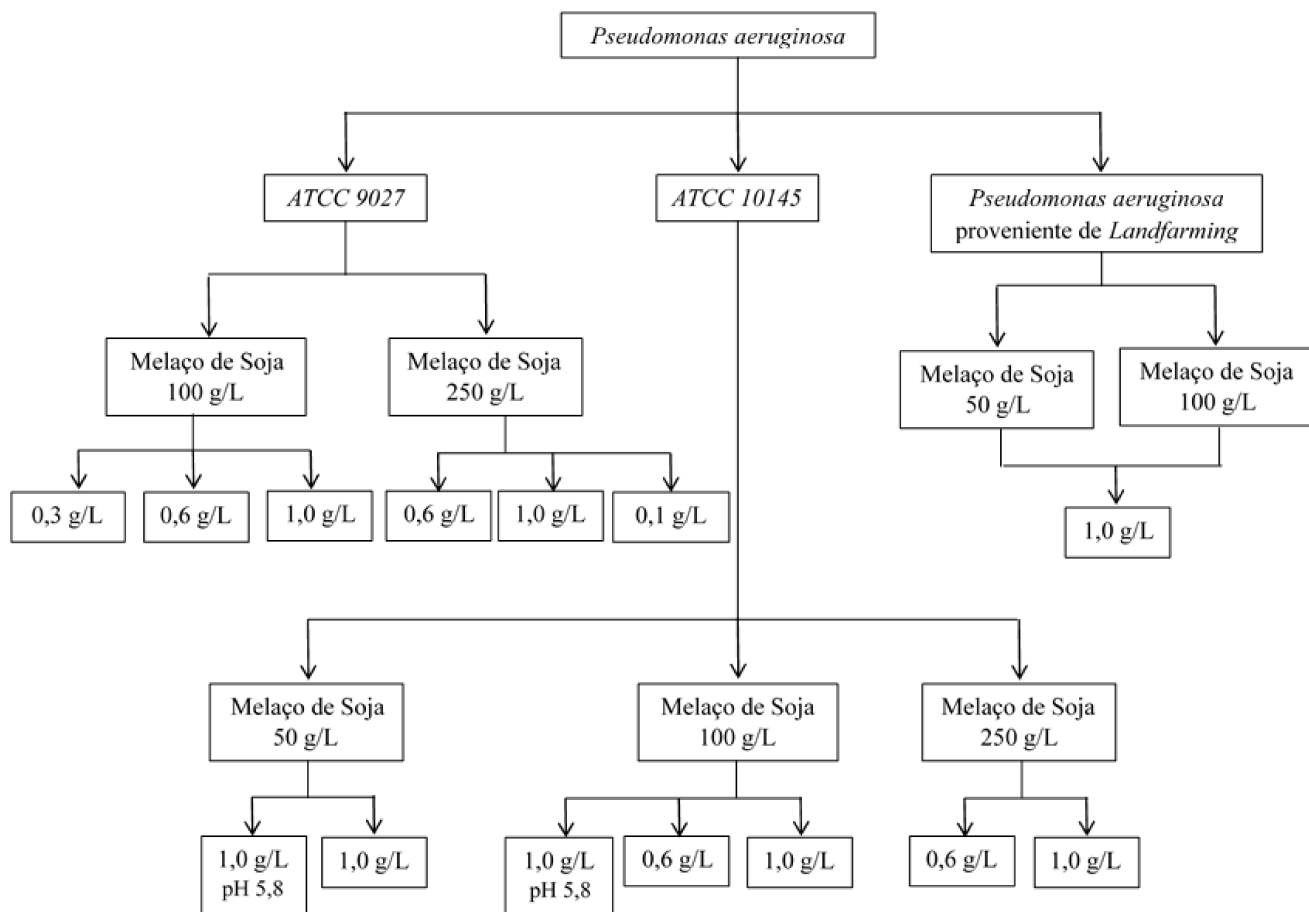


Figura 3.1 – Fluxograma dos testes preliminares.

*3.5.2 - Experimento com preparação de inóculo e adição de nitrato de amônio*

A preparação de inóculo consiste em transferir diretamente as *Pseudomonas aeruginosa* a um meio separado, a fim de reativar o metabolismo das bactérias que estavam sob refrigeração. Após 24 horas de agitação a 120 rpm e temperatura ambiente em uma mesa agitadora, foram utilizados 30 mL desse inóculo em Erlenmeyers contendo outros 120 mL do mesmo meio para que então fosse realizada a fermentação. Desta forma, foi realizado um experimento para verificar se ocorre diferença com o uso do inóculo. O meio teve o pH ajustado para 7,0, utilizando *Pseudomonas aeruginosa* 10145. Foram utilizadas duas concentrações de melaço de soja: 50 g/L e 100 g/L. O tempo de fermentação foi de 72 horas com amostragens a cada 12 horas.

Para avaliar o comportamento das bactérias com maior presença de nitrogênio, outro experimento foi realizado de forma análoga ao anterior, porém na preparação do meio foram adicionados 2 g/L de nitrato de amônio.

### **3.6 – Produção do Biossurfactante**

Com o intuito de reativar o metabolismo dos microrganismos armazenados em tubos de ensaio com meio gelose inclinado, foram adicionados 9 tubos a cada Erlenmeyer de capacidade de 500 mL contendo 450 mL do meio a ser utilizado. Foi realizada uma raspagem na superfície do meio gelose para retirada da bactéria. Por um período de 24 horas o meio permaneceu sob agitação de 120 rpm em temperatura ambiente em uma mesa agitadora.

Após este período, o meio contendo o inóculo foi centrifugado a 12.096 g por 10 minutos. A massa obtida no fundo do recipiente centrifugado foi armazenada e pesada em uma balança semi analítica para que assim constituísse a concentração inicial de microrganismo presente em cada meio. A quantidade estipulada inicialmente foi adicionada a Erlenmeyer de 250 mL contendo 150 mL do mesmo meio utilizado no inóculo. Os Erlenmeyers foram agitados a 120 rpm em temperatura de  $30 \pm 1$  °C por um período total de 72 horas em uma mesa agitadora com controle de temperatura. A Figura 3.2 apresenta um esquema do procedimento experimental utilizado para o planejamento composto central.

Foram retiradas alíquotas de 30 mL a cada 12 horas, sendo estas centrifugadas a 12.096 g por 20 minutos para separação das células presentes (biomassa) e do sobrenadante, que foi utilizado para analisar a concentração de raminose, tensão superficial, índice de emulsificação e concentração de biossurfactante. Todas as amostras foram realizadas em duplicata.

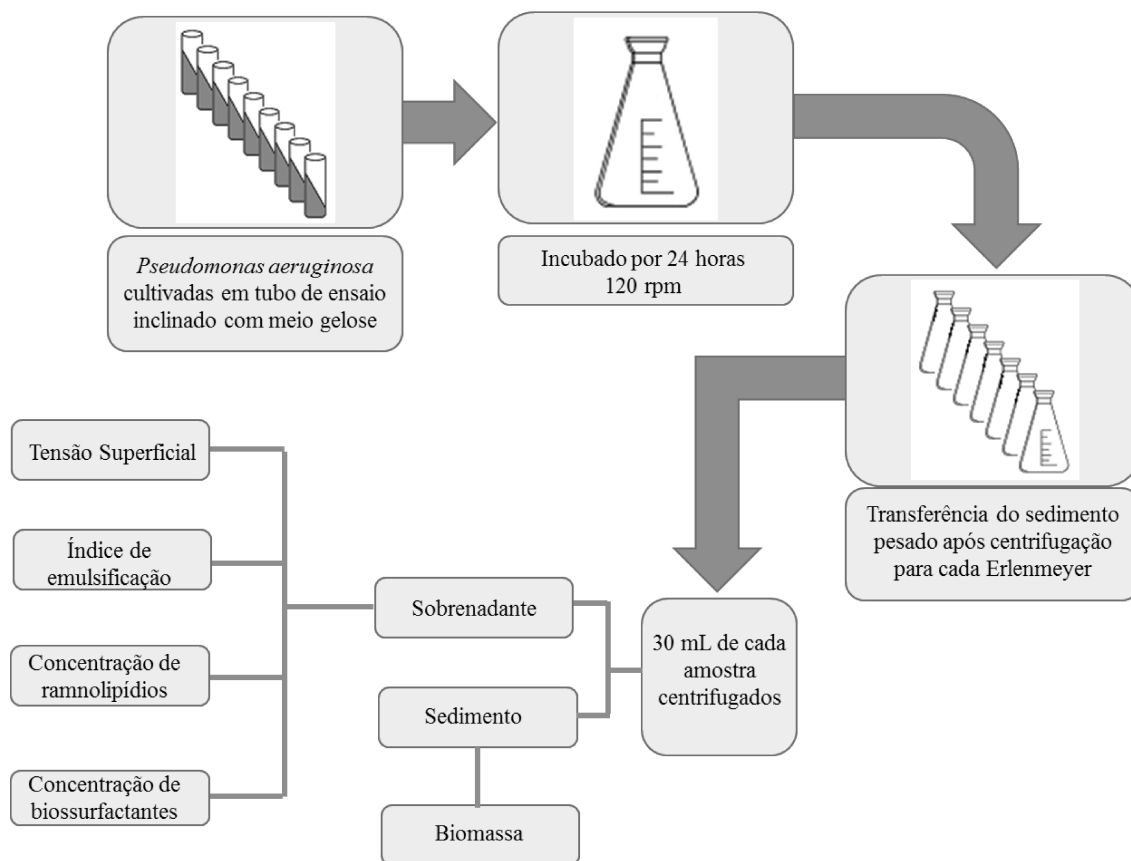


Figura 3.2 – Fluxograma do procedimento experimental.

### 3.7 - Planejamento Composto Central

Um planejamento composto central (PCC) foi proposto para realizar a análise da interação entre as variáveis selecionadas e o efeito que elas possuem na resposta desejada, além de minimizar possíveis erros experimentais, sistemáticos ou estatísticos. Com o objetivo de otimizar o experimento foram analisadas as superfícies de respostas obtidas.

De acordo com Box *et al.* (1978) este tipo de planejamento reduz o tempo de ensaios experimentais, custo relativo aos experimentos, além de propor uma otimização multivariada sem conhecimentos elevados em estatística. Cada variável é estudada a 5 diferentes níveis:  $-\alpha$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $+1$  e  $+\alpha$  e cada nível possui um valor nominal previamente determinado.

O PCC foi elaborado com 2 variáveis: concentração inicial de *Pseudomonas aeruginosa* (CPA) e concentração de melação de soja no meio (CMM) e a 2 níveis ( $2^2$ ) com 3 réplicas no ponto central, totalizando 11 experimentos. O  $\alpha$  utilizado foi o de rotabilidade a fim de ampliar a faixa experimental e seu valor absoluto foi de 1,41. A Tabela 3.2 apresenta as variáveis estudadas, seus valores reais e codificados que foram determinados após resultados obtidos nos

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

testes preliminares. As respostas analisadas foram: tensão superficial, índice de emulsificação, concentração de raminose e concentração de biossurfactante produzido. Todos os dados estatísticos foram calculados com o auxílio do programa *Software Statistica 7.1*, da *StatSoft*.

Tabela 3.2 - Valores reais e codificados de cada variável

Variáveis	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
CMM	29,3	50,0	100,0	150,0	170,7
CPA	0,2	1,0	3,0	5,0	5,8

Todos os níveis das variáveis estudadas foram adimensionalizados (codificados) através da Equação 3.1.

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\left[ \frac{X_{+1} - X_{-1}}{2} \right]} \quad (3.1)$$

$X_n$  = valor codificado da variável ( $n = 1, 2, \dots$ );

$X$  = valor da variável a ser calculada;

$X_0$  = valor da variável no ponto central;

$X_{+1}$  = valor da variável no nível superior;

$X_{-1}$  = valor da variável no nível inferior.

Desta forma, as equações para as variáveis codificadas CMM ( $X_1$ ) e CPA ( $X_2$ ) são mostradas nas Equações 3.2 e 3.3, respectivamente.

$$X_1 = \frac{(CMM - 100)}{50} \quad (3.2)$$

$$X_2 = \frac{(CPA - 3)}{2} \quad (3.3)$$

A Tabela 3.3 apresenta a matriz de planejamento composto central com os valores codificados das variáveis analisadas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Tabela 3.3 - Matriz do planejamento composto central

Experimento	Variáveis Valor Codificado	
	CMM (X <sub>1</sub> )	CPA (X <sub>2</sub> )
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	- $\alpha$	0
6	+ $\alpha$	0
7	0	- $\alpha$
8	0	+ $\alpha$
9	0	0
10	0	0
11	0	0

### **3.8 - Procedimentos analíticos**

Para a realização das análises quantitativas, alíquotas de 30 mL foram retiradas de cada amostra do meio fermentado e centrifugadas a 12.096 g por 20 minutos para remoção das células, em centrífuga da marca Beckman Coulter J-25.

#### *3.8.1 - Tensão Superficial*

A tensão superficial do meio de cultura fermentado foi medida a fim de determinar indiretamente a produção microbiana de biossurfactantes, foi realizada utilizando cerca de 10 mL de meio sobrenadante em uma placa de Petri no Tensiômetro Educacional K6 da marca Láctea previamente calibrado. Para garantir uma leitura mais precisa, antes de todas as análises foi realizada a calibração do tensiômetro utilizando álcool etílico e água destilada.

#### *3.8.2 - Índice de Emulsificação*

O índice de emulsificação foi realizado de acordo com o método descrito por COOPER e GOLDENBERG (1987) que consiste na adição de 6 mL de substrato hidrofóbico e 4 mL da amostra sobrenadante em um tubo de ensaio de vidro com tampa de rosca. Os tubos foram agitados vigorosamente por 2 minutos em um agitador de tubos Vortex (marca Phoenix, modelo

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

---

AP56). Após a agitação, o tubo permaneceu em repouso por 24 horas para que pudesse ser realizada a medida da emulsão formada, dada em porcentagem. O valor do índice de emulsificação corresponde à altura da camada emulsionada dividida pela altura total, calculado pela Equação 3.4.

$$IE = \frac{h_e}{h_t} \times 100 \quad (3.4)$$

sendo: *IE* a porcentagem da emulsão;

*h<sub>e</sub>* a altura emulsionada e

*h<sub>t</sub>* a altura total da mistura.

Foram utilizados óleo de soja, querosene e óleo de motor como material hidrofóbico para esta análise.

### *3.8.3 - Biomassa*

O crescimento celular foi determinado através do valor da massa seca. Após a retirada do sobrenadante pela centrifugação da amostra fermentada, a amostra sólida presente no fundo do recipiente foi resuspensa em água destilada, lavada e centrifugada por três vezes. Após a última centrifugação, a amostra foi resuspensa em água destilada e levada a estufa a 80 °C por 24 horas em uma placa de Petri previamente pesada. A quantificação da massa seca foi realizada pela diferença do peso final e inicial da placa, expressa em gramas por litro (Borges, 2011).

### *3.8.4 - Concentração de Raminose*

Dois etapas foram realizadas para medir a concentração de raminose presente no meio fermentativo. Na primeira, foram adicionados 2 mL da amostra e 2 mL de acetato de etila P.A. em um tubo de ensaio de vidro com rosca e agitado em Vortex por 2 minutos. Após ocorrer a separação de fases, retirou-se 1 mL do sobrenadante para realizar a segunda parte, utilizando o método descrito por Rahman *et al.* (2002). Em um tubo de ensaio de vidro rosqueado foram adicionados 4,5 mL de ácido sulfúrico 70% ao 1 mL retirado anteriormente, o tubo foi agitado vigorosamente em Vortex por 2 minutos e aquecido a 100 °C por 20 minutos. Após o resfriamento da solução adicionou-se 0,1 mL de ácido tioglicólico 3%, deixando-a em repouso, na ausência de luz, por 3 horas. Por fim, realizou-se a leitura da absorbância das soluções em comprimento de onda de 420 nm, em espectrofotômetro da marca Genesys – modelo 10UV.



## ***MATERIAL E MÉTODOS***

---

Previamente, foi realizada uma curva de calibração utilizando diferentes concentrações de amostra padrão de raminose.

### *3.8.5 - Concentração de Biossurfactante*

Para medir a concentração de biossurfactante presente, foram adicionados 2 mL da amostra e 2 mL de acetato de etila P.A. em um tubo de ensaio de vidro com rosca e agitado em Vortex por 2 minutos. Após ocorrer a separação de fases, retirou-se 1 mL do sobrenadante e foi medida a massa seca a 40 °C por 24 horas. A quantificação da concentração de biossurfactante foi realizada pela diferença do peso final e inicial, expressa em gramas por litro.

## **3.9 - Avaliação do biossurfactante**

### *3.9.1 - Quantificação de açúcar*

A identificação e quantificação dos açúcares presentes no meio fermentativo foi realizada por cromatografia líquida de alto desempenho HPLC (High Performance Liquid Chromatography), marca Shimadzu modelo LC-20A Prominence, coluna SUPELCOGEL C-610H. Empregou-se como fase móvel ácido fosfórico (0,1%), com fluxo de 0,5 mL/min, temperatura do forno 32 °C e volume de injeção de 20 µL.

### *3.9.2 - Extração de gordura por Soxhlet*

Para analisar o consumo dos lipídeos presentes durante a produção de biossurfactante foram realizadas duas análises, uma no ponto inicial da fermentação e a outra após 48 horas do processo fermentativo. Foram misturados cerca de 20 g de areia previamente secada em estufa, 1 g de sulfato de sódio anidro e 5 mL de amostra (previamente pesada em balança semi analítica). A mistura foi colocada em um filtro de extração, fechado com algodão. A extração foi realizada utilizando hexano em balão volumétrico de 250 mL (cuja massa inicial foi determinada, após secagem em estufa), por 6 horas, com ciclos de 12 minutos. Após o processo de extração o balão foi secado até massa constante em estufa a 100 °C, resfriado em dessecador por 30 minutos e novamente pesado em balança semi analítica. O teor de gordura, dado em porcentagem, foi calculado de acordo com a Equação 3.5.

$$L[\%] = \frac{M_2 - M_1}{A} \times 100 \quad (3.5)$$

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

---

sendo: M<sub>1</sub>: a massa inicial do recipiente vazio, em gramas;

M<sub>2</sub>: a massa final do recipiente contendo a gordura extraída, em gramas;

A: o peso da amostra, em gramas.

### *3.9.3 - Teor de carbono e nitrogênio*

A quantificação de carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT) presente nas amostras foi realizada com o auxílio do equipamento Total Organic Carbon Analyzer TOC – L CPH/CPN, marca Shimadzu, através da técnica de combustão catalítica a alta temperatura que utiliza uma oxidação única e método não dispersivo de infravermelhos (NDIR) que permite medições de todas as amostras de água ultrapura para a água altamente contaminada com intervalo de medição entre 4 µg/L a 25.000 mg/L.

### *3.9.4 – Concentração micelar crítica (CMC)*

Foram utilizados 120 mL do ponto ótimo obtido através do planejamento composto central. Inicialmente o volume total utilizado foi centrifugado a 12.096 g por 20 min, congelado e liofilizado por 24 horas em um liofilizador - modelo L101 da marca Liotop, a fim de concentrar a amostra. Após a liofilização, a amostra foi resuspensa em 40 mL de água destilada e foram realizadas leituras da tensão superficial de diferentes diluições para obter o gráfico da tensão superficial *versus* concentração de biossurfactante, o ponto de inflexão da curva onde a redução da tensão superficial se mantém constante corresponde à concentração micelar crítica (PLOCINICZAK *et al.*, 2011).

### *3.9.5 – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier*

A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica utilizada em análises qualitativas, síntese e transformações orgânicas. Cujo objetivo é identificar os diferentes grupos funcionais e os seus tipos de ligações, uma vez que possuem distintas frequências e intensidades de absorção no infravermelho (SILVERSTAIN e WEBSTER, 2000). Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier foram obtidos em um espectrofotômetro modelo Spectrum Two da marca Perkin Elmer, utilizando célula de refletância total atenuada (ATR), horizontal de 7 centímetros, com cristal de seleneto de zinco (ZnSe), 16 varreduras, resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, cobrindo a região espectral de 500-4000 cm<sup>-1</sup>. A amostra do biossurfactante utilizada para análise foi similar à extraída no item 3.8.5, utilizando a parte do sobrenadante da amostra.

**3.10 – Teste em reator**

Com o objetivo de estudar a produção de biossurfactantes em reator foi realizado um experimento em biorreator de 2,0 L com volume útil de 1,0 L de meio contendo 120 g/L de melão de soja e 4,0 g/L de concentração inicial de microrganismo. O experimento foi realizado com controle de pH a 7,0 e de temperatura a 30 °C, aeração de 1,2 vvm e agitação de 310 rpm. Foram retiradas alíquotas de 30 mL a cada 12 horas por 48 horas. Foram realizadas as análises de índice de emulsificação, tensão superficial, biomassa e concentração de biossurfactante.

---

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 4.1 – Determinação de gordura

Primeiramente determinou-se que a porcentagem de umidade presente no melaço de soja foi de  $23,3 \pm 1,5\%$  para dar continuidade ao método descrito por Bligh-Dyer. A secagem em estufa ocorreu até obter massa constante e a quantidade de gordura presente foi de  $34,6 \pm 1,5\%$ .

### 4.2 – Testes Preliminares

Foram realizados nove testes preliminares para determinar as melhores condições para otimizar a produção de biossurfactantes. Os testes foram iniciados com condições relatadas na literatura. Borges (2011) e Lima (2007) estudaram a produção de raminolipídeos com o pH do meio ajustado para 7,0. Junior (2013) estudou a produção de lipases utilizando concentrações de melaço de soja entre 32 e 368 g/L.

No primeiro teste as condições foram: meio fermentativo com 250 g/L de melaço de soja, pH ajustado para 7,0, sem preparação de inóculo, ou seja, com fermentação direta e 0,1 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 9027. As amostras foram avaliadas quanto a tensão superficial e o crescimento celular (biomassa). A Figura 4.1 apresenta o comportamento das duas análises ao longo do tempo.

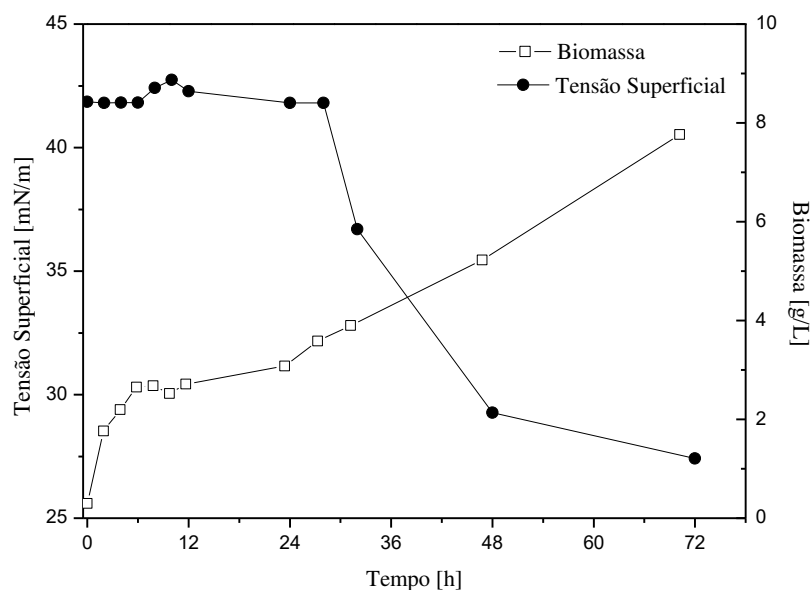


Figura 4.1 - Tensão superficial e biomassa ao longo do tempo para melaço de soja 250 g/L, pH 7,0 e 0,1 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 9027.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento celular se deu, principalmente, a partir de 36 horas tendo um crescimento exponencial a partir deste ponto. A tensão superficial diminuiu a partir de 30 horas e decaiu até o final das 72 horas, atingindo cerca de 27 mN/m. Com a diminuição significativa da tensão superficial verificou-se indiretamente a formação de biossurfactante no meio. O índice de emulsificação foi realizado com querosene e óleo de motor, no entanto os valores observados para a querosene não foram significativos, não apresentando emulsões. Já o óleo de motor apresentou valores altos próximos a 100% para todas as amostras, inclusive no ponto inicial onde ainda não ocorreu a produção de biossurfactante, podendo este produto apresentar compostos capazes de emulsionar sem que tenha presença de surfactante no meio analisado. Portanto esta análise foi desprezada para esta avaliação.

No segundo teste avaliou-se a tensão superficial, o crescimento celular (biomassa) e a concentração de biossurfactante. A Figura 4.2 mostra os resultados obtidos para cada uma das análises em função do tempo em horas.

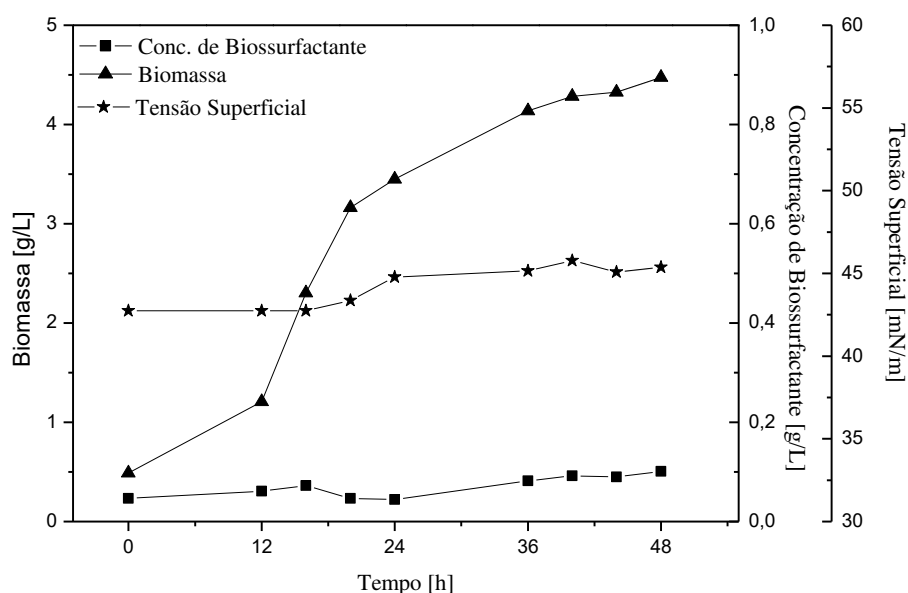


Figura 4.2 - Análises de tensão superficial, biomassa e concentração de biossurfactante em função do tempo para meio fermentativo com 100 g/L de melaço de soja, pH ajustado para 7,0, sem inóculo e 0,3 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 9027.

A biomassa apresentou crescimento exponencial no meio fermentativo, porém não houve produção de biossurfactante e a tensão superficial aumentou ao longo do tempo, este fato pode ter ocorrido devido ao consumo de componentes do meio pelas bactérias. Desta forma, este teste não apresentou bons resultados mostrando-se inconclusivo. Novos testes foram realizados para quantificar o índice de emulsificação, foram utilizados querosene, óleo de motor

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

e óleo de soja. O último apresentou emulsões mais estáveis e valores coerentes aos encontrados na literatura, a partir de então todos os outros experimentos foram realizados com este material.

No terceiro teste, com o objetivo de diferenciar as concentrações de melação dos testes 1 e 2, realizou-se quatro diferentes fermentações. As análises realizadas foram: biomassa (BM), concentração de biossurfactante (CB), índice de emulsificação (IE) e tensão superficial (TS). A Figura 4.3 mostra o comportamento do crescimento celular para cada uma das condições citadas acima. Nela é possível notar que o crescimento celular foi maior para a concentração de 250 g/L nas duas condições em relação às de 100 g/L, uma vez que as bactérias dispunham de maior quantidade de carboidratos, lipídeos, dentre outros por possuírem maior concentração dos mesmos.

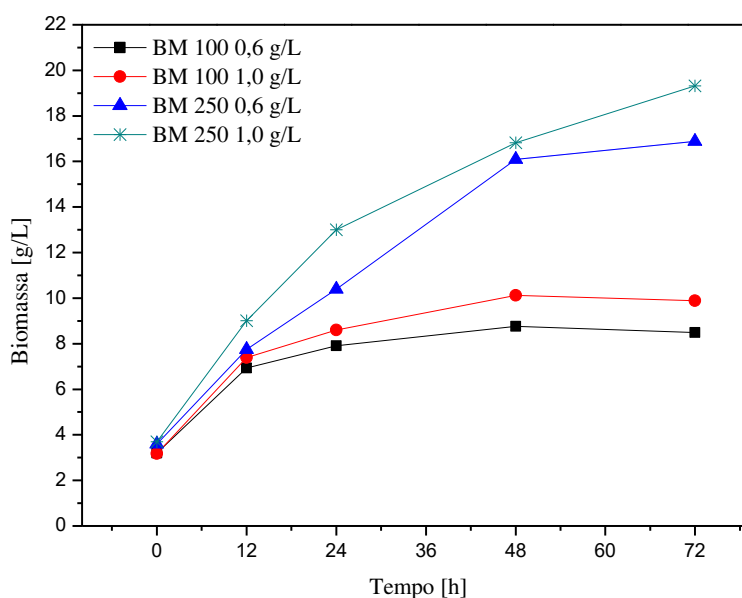


Figura 4.3 - Biomassa (BM) ao longo do tempo para as condições de 100 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 9027; 100 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 9027; 250 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 9027 e 250 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 9027.

A Figura 4.4 apresenta os dados da concentração de biossurfactante ao longo do tempo, assim como na figura anterior, as condições com maior concentração de melação apresentaram maiores valores da concentração de biossurfactante no meio. O crescimento ocorreu principalmente nas primeiras 24 horas, após esse período manteve-se constante ou com pequena variação. O comportamento das concentrações de 100 g/L foi semelhante independente da concentração inicial de microrganismo. De forma análoga para as concentrações de 250 g/L,

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

porém a concentração final de biossurfactante foi maior para a condição, cuja concentração inicial de microrganismo é menor.

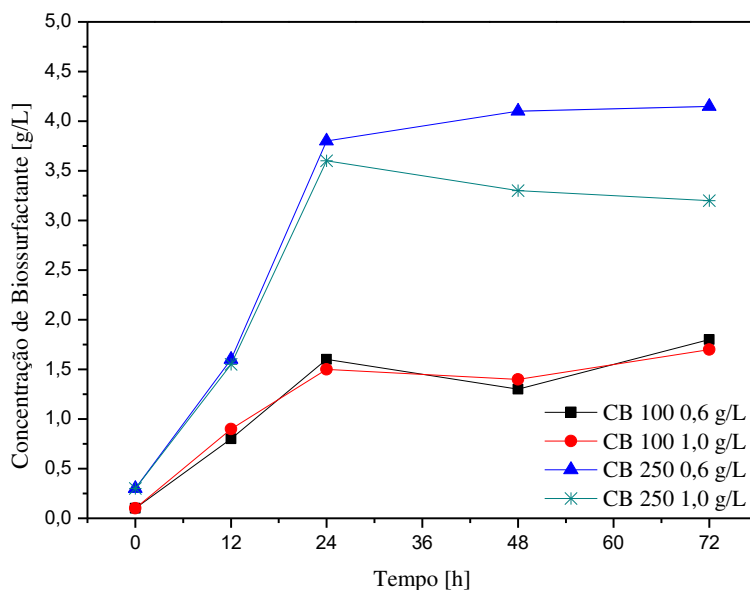


Figura 4.4 - Concentração de biossurfactante (CB) ao longo do tempo para as condições de 100 g/L de melão de soja no meio e 0,6 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 9027; 100 g/L de melão de soja no meio e 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 9027; 250 g/L de melão de soja no meio e 0,6 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 9027 e 250 g/L de melão de soja no meio e 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 9027.

A Figura 4.5 mostra o comportamento do índice de emulsificação ao longo do tempo. As emulsões apresentaram valores significativos nas primeiras 12 horas, após esse período apenas a concentração de 100 g/L aumentou apresentando índices de até 70% de emulsificação, as outras condições permaneceram constantes ou variaram pouco. Já a Figura 4.6 mostrou que houve grande variação nos valores da tensão superficial, tendo atingido redução dos valores próximo a 24 horas e posterior aumento, apresentando instabilidade independente das concentrações avaliadas. Os valores iniciais da tensão superficial apontam que o melão de soja possui componentes capazes de reduzir a tensão superficial do meio.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

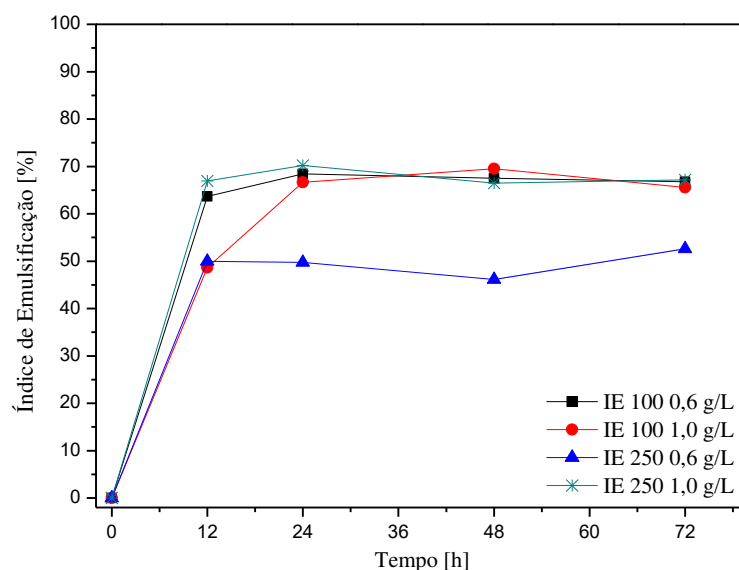


Figura 4.5 - Índice de emulsificação (IE) ao longo do tempo para as condições de 100 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 9027; 100 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 9027; 250 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 9027 e 250 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 9027.

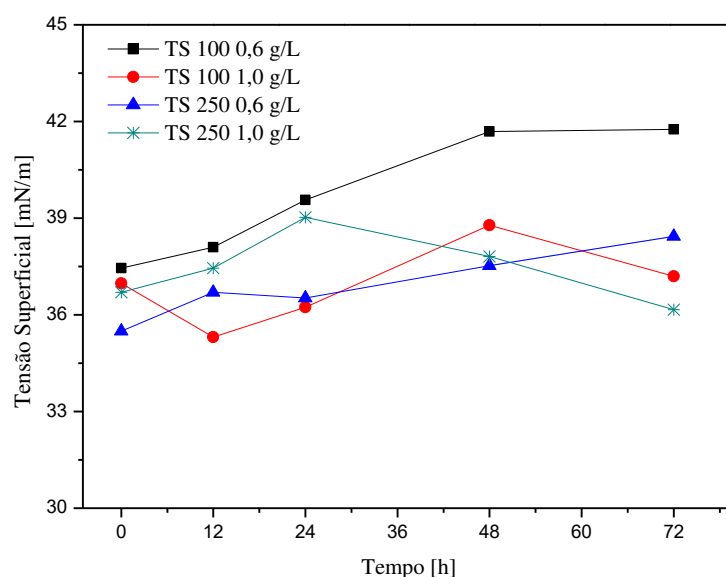


Figura 4.6 - Tensão superficial (TS) ao longo do tempo para as condições de 100 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 9027; 100 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 9027; 250 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 9027 e 250 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 9027.

Desta forma, pelo comportamento apresentado pelas Figuras 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6 é possível notar que houve produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* 9027, porém



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

o biossurfactante produzido mostrou emulsões estáveis após 24 horas e não se apresentou como bom redutor da tensão superficial.

O quarto teste preliminar foi realizado nas mesmas condições do terceiro teste, mas com a *Pseudomonas aeruginosa* 10145. As análises realizadas foram: biomassa, concentração de biossurfactante, índice de emulsificação e tensão superficial. O comportamento da biomassa apresentado na Figura 4.7, mostra que o crescimento celular também foi maior para as condições com concentrações de melação de 250 g/L. O crescimento exponencial ocorreu nas primeiras 24 horas, depois desse período a variação foi menor. Para concentrações de melação de soja iguais o comportamento se deu de forma similar. Apontando que a variação ocorre de forma significativa para diferentes concentrações de melação e independe do valor inicial do microrganismo. Assim como o mostrado na Figura 4.8 em que a concentração de biossurfactante foi maior para as concentrações de 250 g/L quando comparada às concentrações de melação de 100 g/L.

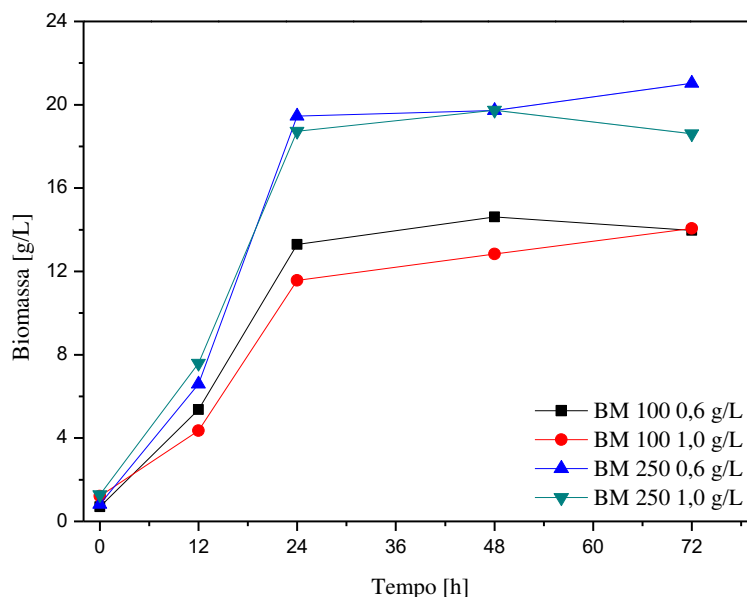


Figura 4.7 - Biomassa (BM) ao longo do tempo para as condições 100 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145; 100 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145; 250 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145 e 250 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145.

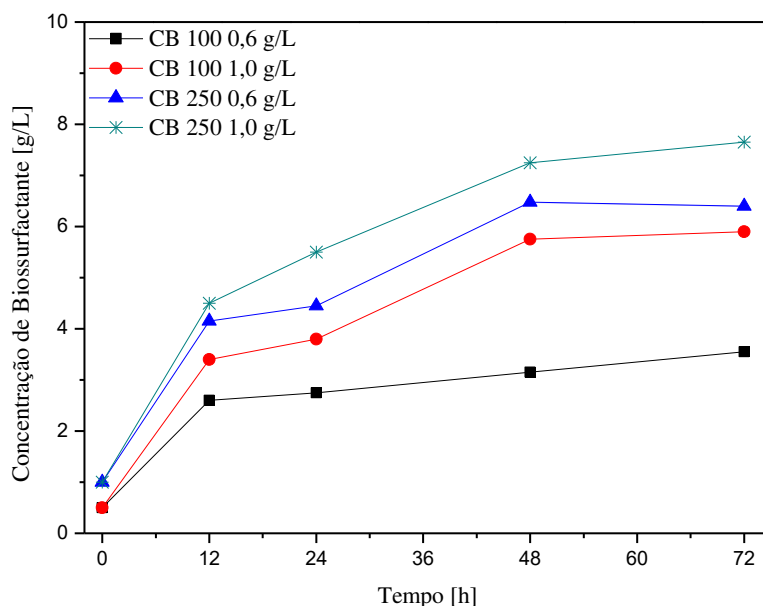


Figura 4.8 - Concentração de biossurfactante (CB) ao longo do tempo para as condições 100 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145; 100 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145; 250 g/L de melação de soja no meio e 0,6 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145 e 250 g/L de melação de soja no meio e 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145.

O índice de emulsificação não apresentou diferença significativa nas concentrações de melação utilizando *Pseudomonas aeruginosa* 10145. Na Figura 4.9 pode-se verificar tal comportamento, sendo praticamente uniforme e estável, com maiores valores e crescimento significativo a partir de 24 horas de produção. Comportamento melhor quando comparado ao teste anterior, a tensão superficial apresentou-se mais estável, conforme Figura 4.10. Apresentou leve aumento nas 12 horas iniciais e reduziu até 48 horas, permanecendo constante ou com pouca variação. As menores reduções foram apresentadas para concentrações de 100 g/L. Desta forma, este experimento produziu biossurfactante que apresentou emulsões estáveis independente das concentrações de melação de soja e de microrganismo e mostrou capacidade de redução da tensão superficial.

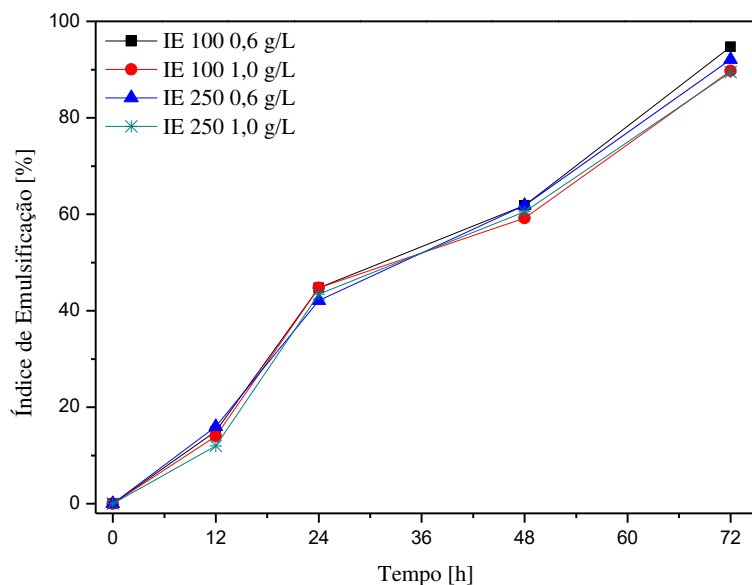


Figura 4.9 - Índice de emulsificação (IE) ao longo do tempo para as condições 100 g/L de melão de soja no meio e 0,6 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145; 100 g/L de melão de soja no meio e 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145; 250 g/L de melão de soja no meio e 0,6 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145 e 250 g/L de melão de soja no meio e 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145.

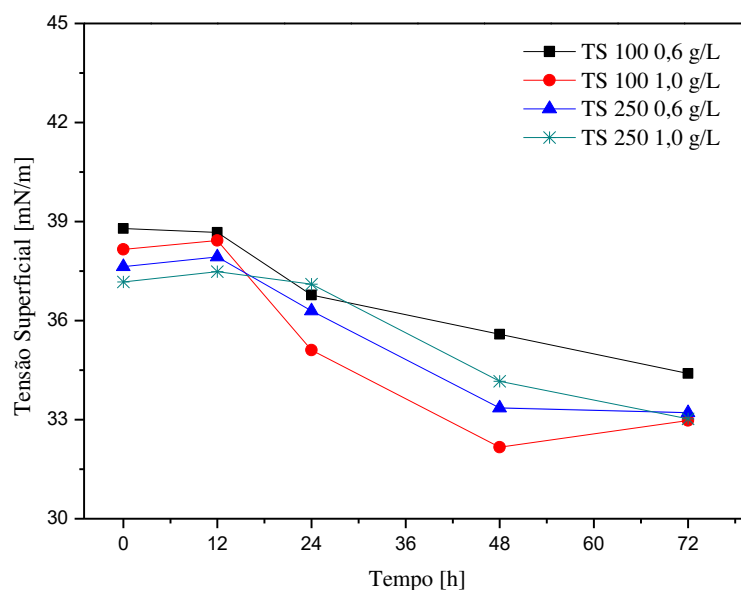


Figura 4.10 - Tensão superficial (TS) ao longo do tempo para as condições 100 g/L de melão de soja no meio e 0,6 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145; 100 g/L de melão de soja no meio e 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145; 250 g/L de melão de soja no meio e 0,6 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145 e 250 g/L de melão de soja no meio e 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de estudar o comportamento da produção de biossurfactante com menor concentração de melão de soja e o pH do meio, o quinto e o sexto experimentos diferenciaram-se no ajuste do pH com concentrações de 50 e 100 g/L. No quinto o pH era o do meio, próximo a 5,8 e o sexto foi ajustado para 7,0. A Figura 4.11 mostrou que independente do ajuste de pH, concentrações mais altas de melão apresentaram maiores valores finais de biomassa. Porém, com o ajuste de pH as concentrações de 100 g/L apresentaram valores ainda mais altos, caracterizando melhores resultados quando fermentados em meio neutro.

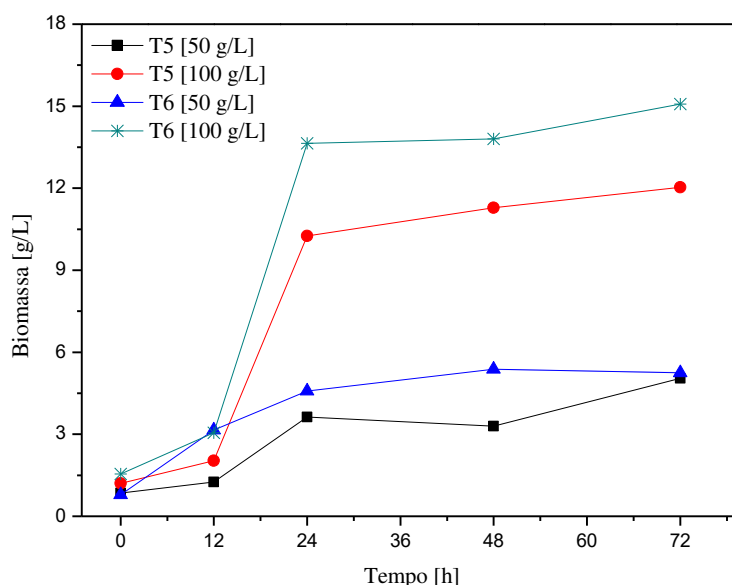


Figura 4.11 - Biomassa ao longo do tempo para os testes preliminares T5 em pH 5,8 e T6 em pH 7,0 para as concentrações de 50 g/L e 100 g/L de melão de soja no meio e cada uma com 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145.

A concentração de biossurfactante apresentou maior variação quando comparados os pH's, conforme Figura 4.12. Como relatado anteriormente os maiores valores de concentração de biossurfactante foram apresentados em concentrações mais altas de melão de soja. As duas condições com ajuste de pH obtiveram valores mais altos para a concentração de biossurfactante, porém os maiores resultados foram apresentados para a concentração de 100 g/L com ajuste de pH. A Figura 4.13 apresenta o comportamento do índice de emulsificação, não caracterizando diferenças significativas, todas as condições tiveram comportamentos parecidos, aumento ao longo do tempo e estabilidade da emulsão.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

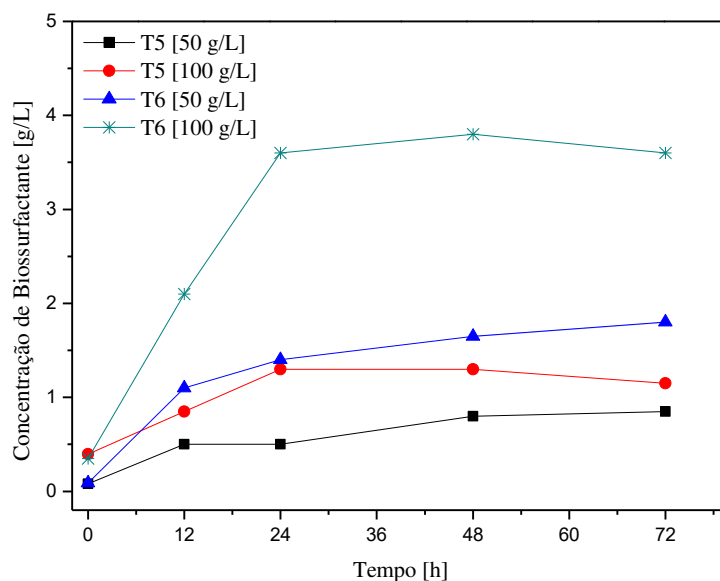


Figura 4.12 - Concentração de biossurfactante ao longo do tempo para os testes preliminares T5 em pH 5,8 e T6 em pH 7,0 para as concentrações de 50 g/L e 100 g/L de melão de soja no meio e cada uma com 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145.

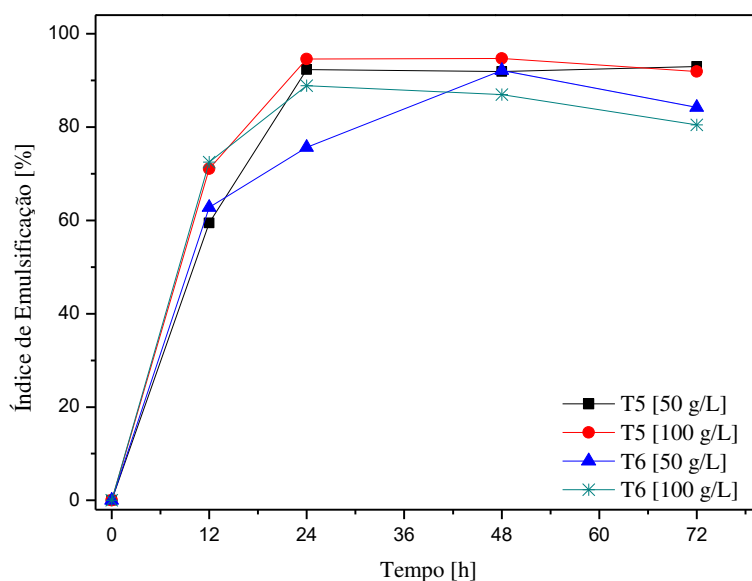


Figura 4.13 - Índice de emulsificação ao longo para os testes preliminares T5 em pH 5,8 e T6 em pH 7,0 para as concentrações de 50 g/L e 100 g/L de melão de soja no meio e cada uma com 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145.

A Figura 4.14 apresenta a tensão superficial dos respectivos testes preliminares, todas as quatro condições apresentaram redução e comportamento semelhante, porém a concentração de 100 g/L, cujo pH foi ajustado, apresentou maiores índices de redução do valor final da tensão superficial. Desta forma, com os dados obtidos neste teste é possível afirmar que o ajuste de pH produz maior quantidade de biossurfactante e é mais eficiente na redução da tensão superficial. A concentração de 50 g/L mostrou resultados promissores.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

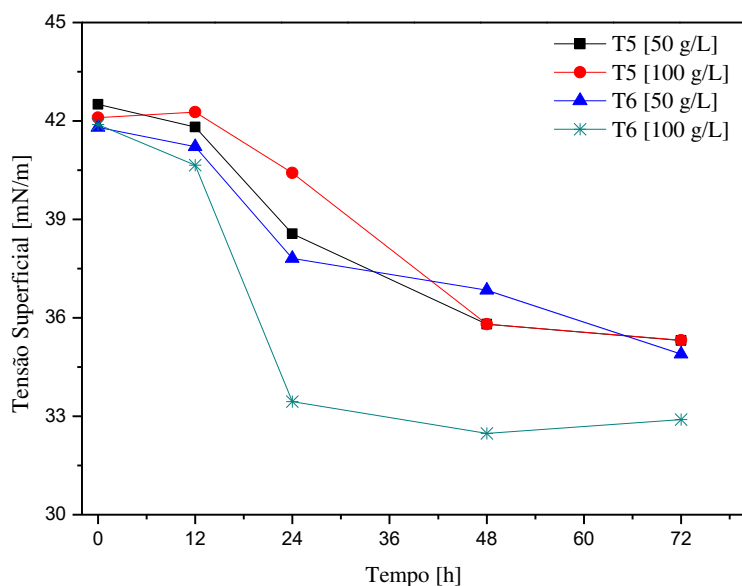


Figura 4.14 - Tensão superficial ao longo do tempo para os testes preliminares T5 em pH 5,8 e T6 em pH 7,0 para as concentrações de 50 g/L e 100 g/L de meloço de soja no meio e cada uma com 1,0 g/L de *Pseudomonas aeruginosa* 10145.

O sétimo teste preliminar analisou os resultados obtidos para os experimentos realizados com as *Pseudomonas aeruginosa* proveniente de *Landfarming*. A Figura 4.15 mostrou o crescimento celular e a concentração de biossurfactante, neste experimento, as duas análises também apresentaram os maiores valores para concentrações de 100 g/L, seguindo certo “padrão” relatado anteriormente, em que concentrações mais altas apresentam maiores valores para as duas respostas.

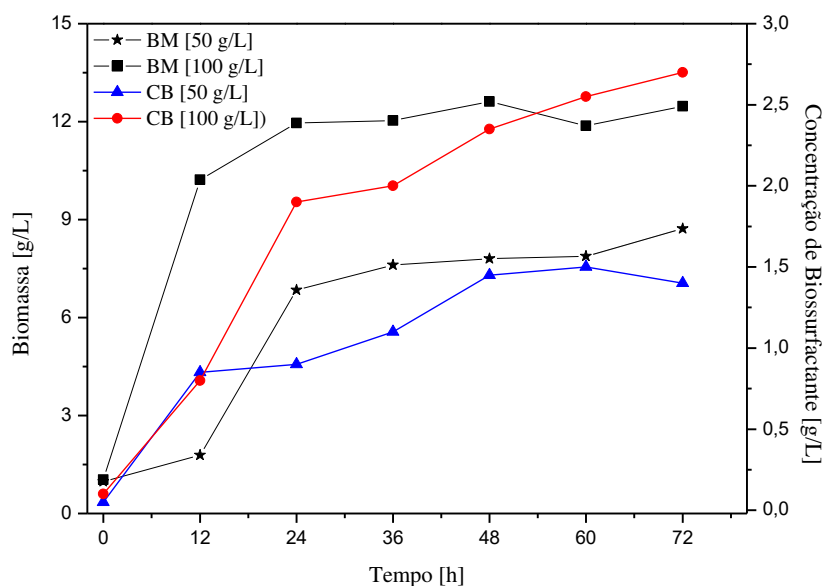


Figura 4.15 – Biomassa (BM) e concentração de biossurfactante (CB) ao longo do tempo para *Pseudomonas aeruginosa* proveniente de *Landfarming*, pH 7,0, fermentação direta, concentração de 50 g/L e 100 g/L de meloço de soja e 1,0 g/L de microrganismos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a tensão superficial com este tipo de bactéria, o menor valor e maior redução aconteceu para concentrações de 50 g/L, porém ambas condições apresentaram comportamento similar. Já o índice de emulsificação apresentou valores bem distintos, porém estáveis. Com concentração mais baixa obteve maior emulsão e concentração mais alta a média da emulsão permaneceu em torno de 60%. Em contrapartida, os valores de tensão superficial e índice de emulsificação acordam, uma vez que são dois índices utilizados para classificar um surfactante. Sendo assim, para este tipo de bactéria concentrações de 50 g/L de melação de soja apresentara biossurfactante mais eficiente na estabilização das emulsões e na redução da tensão superficial (Figura 4.16).

De forma geral, os testes preliminares anteriores apresentaram resultados melhores para a cepa bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* 10145 e para os valores de 50 e 100 g/L de melação de soja. Apresentaram biossurfactante mais eficiente quando avaliadas a emulsão e a tensão superficial.

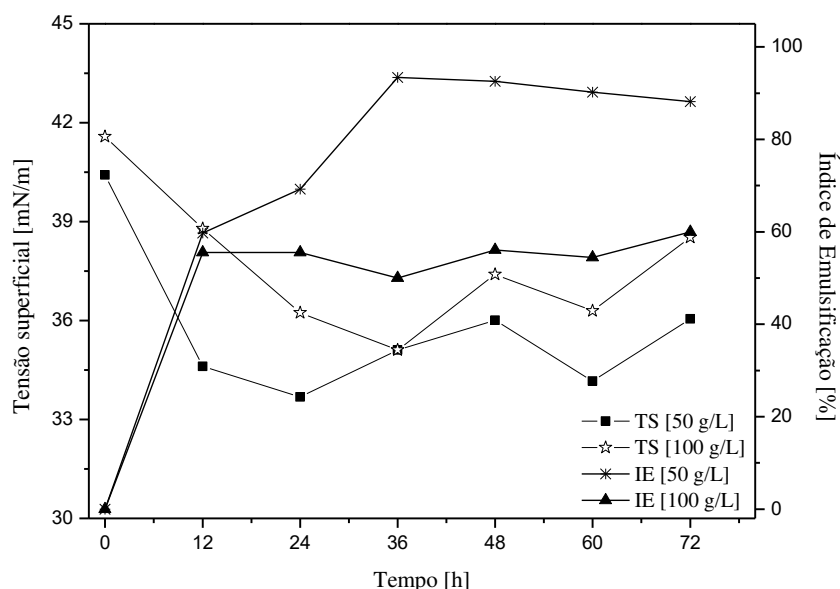


Figura 4.16 - Tensão superficial (TS) e índice de emulsificação (IE) ao longo do tempo para *Pseudomonas aeruginosa* proveniente de *Landfarming*, pH 7,0, fermentação direta, concentração de 50 g/L e 100 g/L de melação de soja e 1,0 g/L de microrganismos.

### 4.2.1 Experimentos com preparação de Inóculo e adição de Nitrato de Amônio

Os experimentos 8 e 9 foram comparados em conjunto, uma vez que a diferença está na adição de 2 g/L de nitrato de amônio no último teste. Em ambos os testes foi realizada a preparação de inóculo para reativar o metabolismo das bactérias. A primeira avaliação foi a do crescimento celular, mostrado na Figura 4.17. Para a biomassa, independente da adição nitrato

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

de amônio não houve interferência significativa no resultado, apenas as concentrações de melão de soja influenciaram, mostrando que para valores mais altos da concentração de melão, maior a biomassa produzida no processo fermentativo.

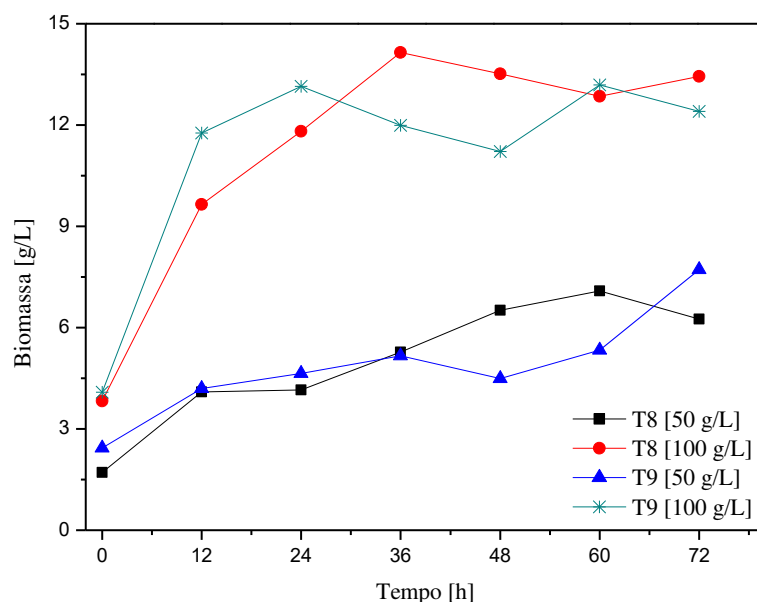


Figura 4.17 - Biomassa ao longo do tempo para os experimentos com inóculo preparado por 24 horas com *Pseudomonas aeruginosa* 10145 e adição de 30 mL em cada Erlenmeyer contendo 120 mL do respectivo meio, concentrações de 50 g/L e 100 g/L, pH 7,0, experimento 9 com adição de nitrato.

Para a concentração de biossurfactante, mostrado na Figura 4.18, a produção de biossurfactante foi maior sem a adição de nitrato de amônio independente da concentração de melão de soja. Porém ao comparar os experimentos que não possuem adição de nitrato, a concentração de melão de soja influenciou na produção de biossurfactante, sendo a concentração de 100 g/L a que obteve maiores resultados. Os valores iniciais foram mais altos devido a preparação do inóculo, que conseqüentemente produziu biossurfactante durante o período de 24 horas.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

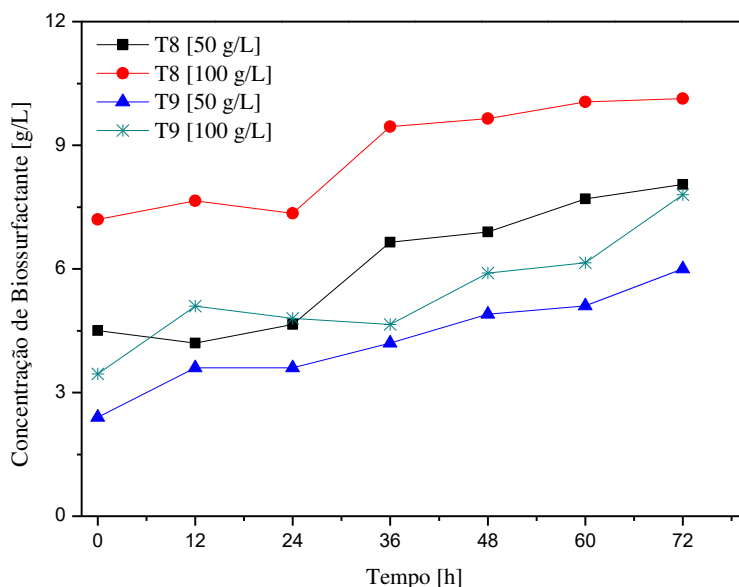


Figura 4.18 - Concentração de biossurfactante ao longo do tempo para os experimentos com inóculo preparado por 24 horas com *Pseudomonas aeruginosa* 10145 e adição de 30 mL em cada Erlenmeyer contendo 120 mL do respectivo meio, concentrações de 50 g/L e 100 g/L, pH 7,0, experimento 9 com adição de nitrato.

O comportamento do índice de emulsificação, Figura 4.19, mostra ser similar para as diferentes condições analisadas. A partir de 48 horas não houve mais variação significativa ou mantiveram-se constantes, apresentando valores acima de 90%, exceto para a condição de 50 g/L sem adição de nitrato que apresentou índices mais baixos. Os valores iniciais foram relatados mais altos, dado que, com a adição de inóculo após 24 horas poderia ter presença de biossurfactante já produzido.

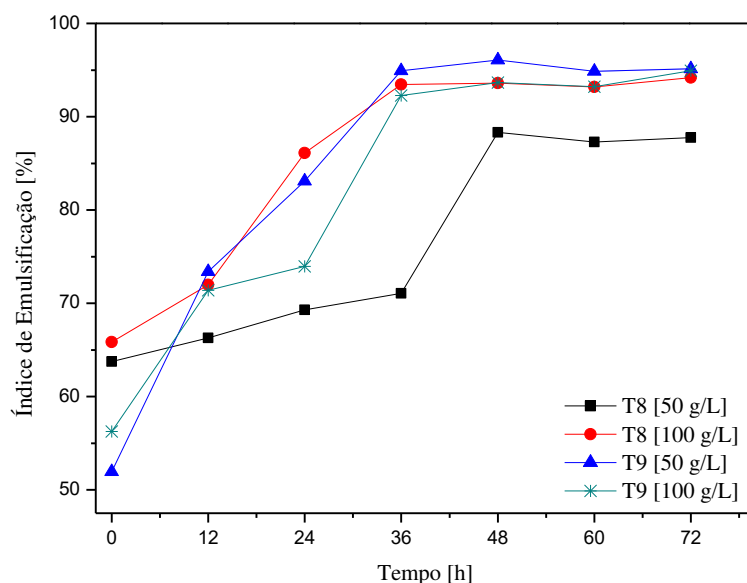


Figura 4.19 - Índice de emulsificação ao longo do tempo para os experimentos com inóculo preparado por 24 horas com *Pseudomonas aeruginosa* 10145 e adição de 30 mL em cada Erlenmeyer contendo 120 mL do respectivo meio, concentrações de 50 g/L e 100 g/L, pH 7,0, experimento 9 com adição de nitrato.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 4.20 a tensão superficial também apresenta comportamento semelhante, no teste preliminar 9 apresentou maiores valores de tensão superficial inicial quando comparado sem a adição de nitrato de amônio. A maior redução aconteceu para a condição de 100 g/L com adição de nitrato de amônio. Porém, pelos resultados pode-se afirmar que não há necessidade adição de nitrato de amônio, Benincasa *et al.* (2002) afirmam que o microrganismo dirige seu metabolismo para a produção de biossurfactantes após o consumo de nitrogênio total do meio de cultivo, cuja produção aumenta após a fase exponencial de crescimento. De forma geral, a ativação prévia do metabolismo das bactérias por meio de inóculo apresentou melhores valores de produção de biossurfactante e este mostrou-se mais eficiente quanto aos índices de emulsificação e tensão superficial.

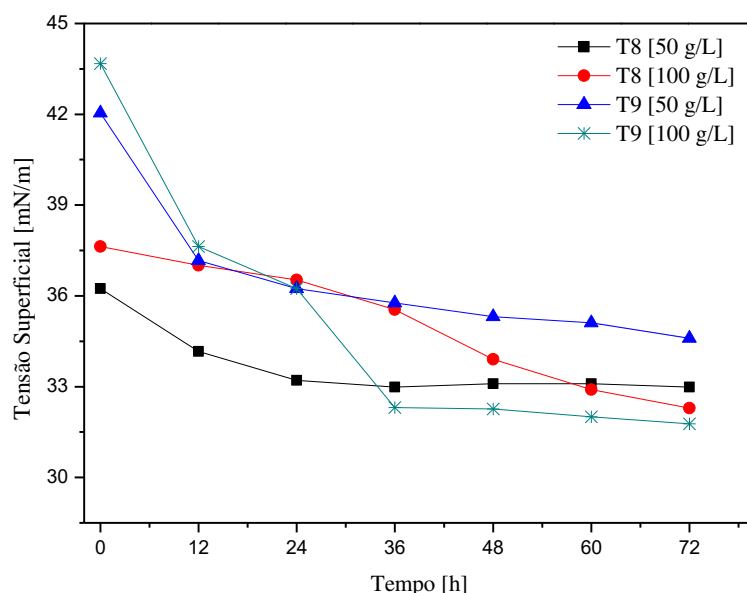


Figura 4.20 - Tensão superficial ao longo do tempo para os experimentos com inóculo preparado por 24 horas com *Pseudomonas aeruginosa* 10145 e adição de 30 mL em cada Erlenmeyer contendo 120 mL do respectivo meio, concentrações de 50 g/L e 100 g/L, pH 7,0, experimento 9 com adição de nitrato.

### 4.3 – Planejamento composto central

Para a realização do planejamento composto central levou-se em consideração os dados obtidos nos testes preliminares. Os melhores resultados foram apresentados com *Pseudomonas aeruginosa* 10145, com inóculo, pH ajustado para 7,0 e não houve variação significativa que necessitasse da adição de nitrato de amônio.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização dos experimentos, os dados obtidos após 48 horas de fermentação permaneceram constantes ou não apresentaram variação significativa. Dessa forma os dados utilizados para análise do planejamento foram os resultados para 48 horas de fermentação. A Tabela 4.1 apresenta o planejamento composto central, com as variáveis estudadas: concentração de melão de soja (CMM) e concentração inicial de microrganismo (CPA). Além dos resultados da tensão superficial (TS), índice de emulsificação (IE), concentração de raminose (RM) e concentração de biossurfactante (CB) obtidos no tempo sugerido. Cada resultado obtido foi analisado individualmente e, para a análise de todas as respostas os parâmetros com mais de 10% de significância em um teste de hipótese *t de Student* foram desprezados.

Tabela 4.1 - Planejamento composto central com as variáveis estudadas e as respostas analisadas

Exp.	CMM (X <sub>1</sub> ) [g/L]	CPA (X <sub>2</sub> ) [g/L]	TS [mN/m]	IE [%]	RM [g/L]	CB [g/L]
1	50,0	1,0	40,2	89,2	2,6	6,6
2	50,0	5,0	35,2	92,7	3,5	8,5
3	150,0	1,0	38,1	92,3	4,9	10,1
4	150,0	5,0	34,1	93,4	5,3	12,6
5	29,3	3,0	37,5	90,1	2,1	4,6
6	170,7	3,0	35,5	91,1	5,1	10,3
7	100,0	0,2	36,8	91,2	4,4	9,1
8	100,0	5,8	33,8	93,0	5,0	10,4
9	100,0	3,0	31,7	94,9	7,9	12,0
10	100,0	3,0	32,3	95,0	7,5	11,4
11	100,0	3,0	30,9	95,9	7,2	11,1

### 4.3.1 - Tensão Superficial

A resposta tensão superficial foi analisada pelos dados fornecidos pela Tabela 4.1 e pelo digrama de Pareto mostrado na Figura 4.21. No diagrama é possível notar que a variável com comportamento linear que possui maior influência no valor final da tensão superficial é a concentração inicial de microrganismo (X<sub>2</sub>).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

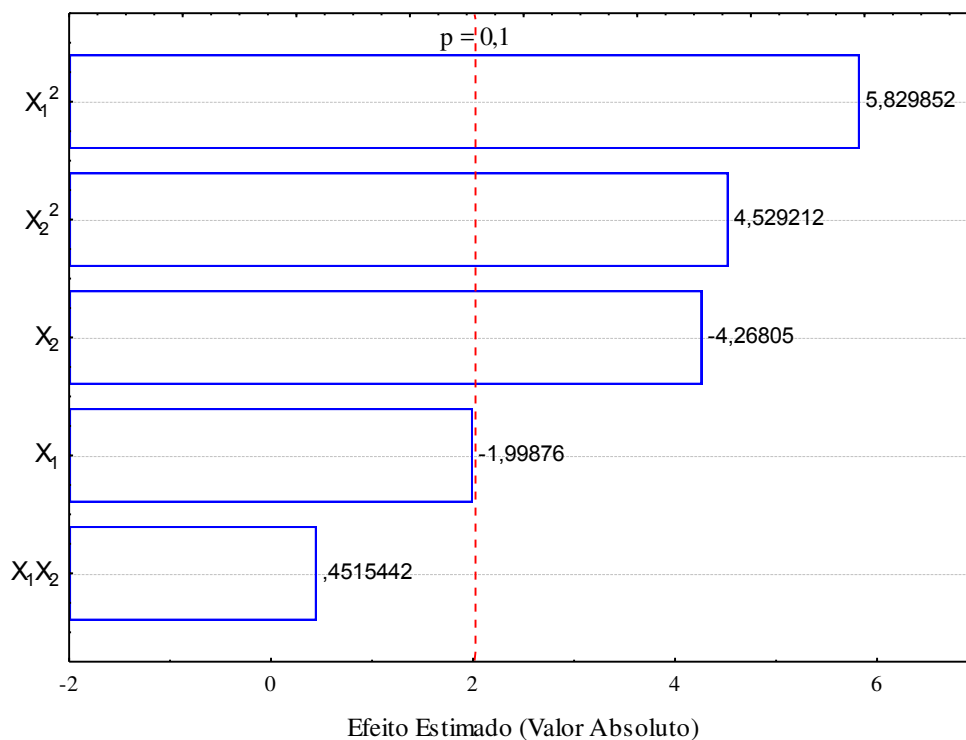


Figura 4.21 - Diagrama de Pareto em relação às variáveis estudadas para a tensão superficial.

Após análise dos dados no programa *STATISTICA*, a Equação 4.1 mostra o modelo ajustado para a resposta tensão superficial.

$$TS = 31,62 - 0,78X_1 + 2,69X_1^2 - 1,65X_2 + 2,09X_2^2 \quad (4.1)$$

O valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,93, o que indica que cerca de 93% dos dados experimentais se ajustam ao modelo. Os valores negativos de  $X_1$  e  $X_2$  mostram que concentrações iniciais mais altas de melação de soja e de microrganismo diminuem a resposta tensão superficial. Ao analisar os dados obtidos pela Tabela 4.1 é possível perceber que alguns experimentos se comportam de tal forma, como por exemplo 1 e 2; 1 e 3; 2 e 4; 3 e 4.

A Figura 4.22 mostra a distribuição dos resíduos em relação aos valores preditos pelo modelo. O comportamento dos resíduos girou em torno de zero e sem tendências o que indica variância constante para todos os valores da resposta.

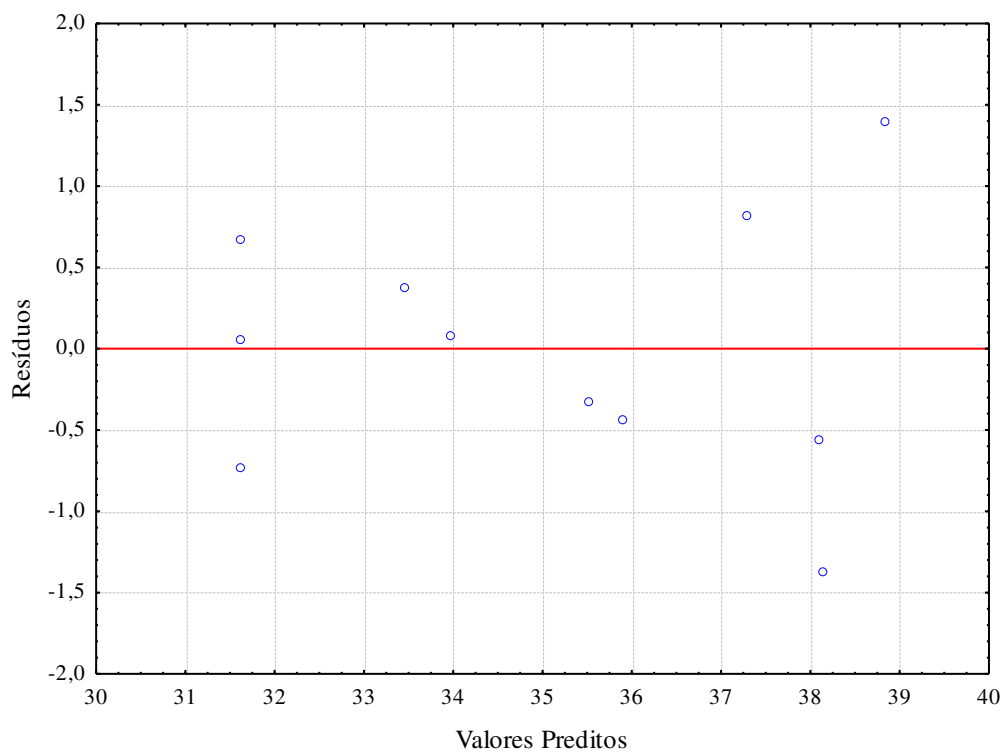


Figura 4.22 - Distribuição dos resíduos relativos à tensão superficial.

A Figura 4.23 mostra a distribuição dos valores preditos em função dos valores observados, nela é possível notar a proximidade dos valores observados com os valores preditos. O que verifica que o modelo é apropriado para a análise dos dados.

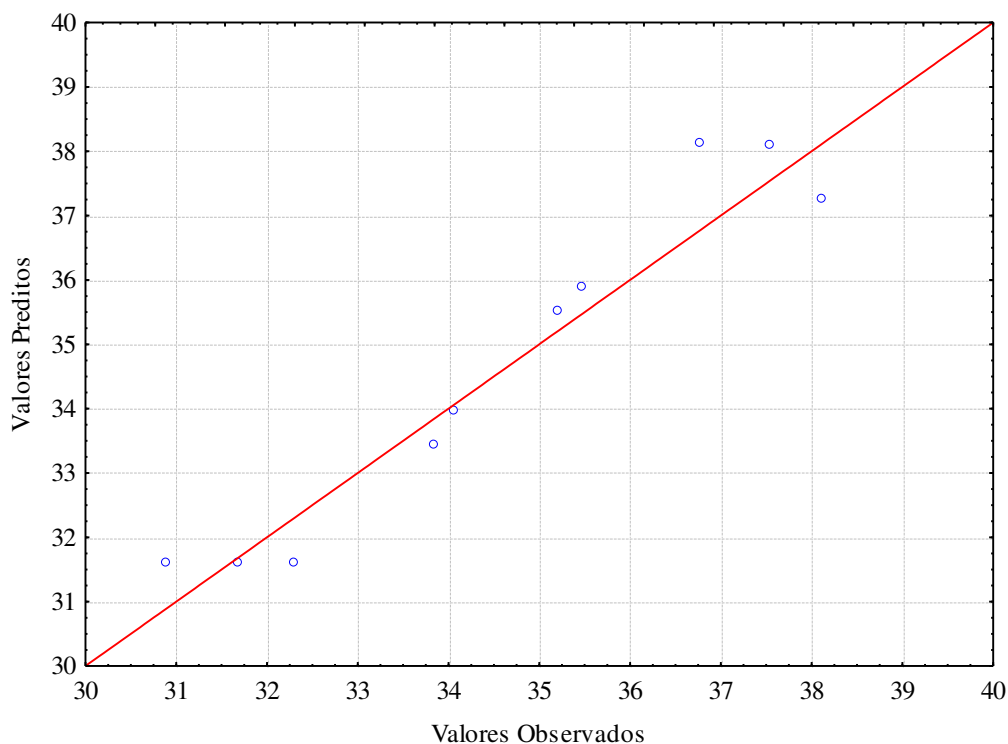


Figura 4.23 - Valores preditos em função dos valores observados relativos à tensão superficial.

A partir da Equação 4.1 e com o auxílio do *software Maple 9.5* o ponto estacionário foi calculado para a tensão superficial. Os valores obtidos foram  $\lambda_1 = 2,065$  e  $\lambda_2 = 2,715$ . Estes valores indicam que há um ponto de mínimo para a resposta tensão superficial, uma vez que os sinais de  $\lambda$ 's são iguais e positivos. Desta forma, calculou-se também os valores de  $X_1$  e  $X_2$  que minimizam a resposta, sendo  $X_1 = 0,127$  e  $X_2 = 0,387$ .

Assim, ao substituir os valores de  $X_1$  e  $X_2$  nas equações codificadas apresentadas pelas Equações 3.2 e 3.3, tem-se que os valores reais das concentrações iniciais das variáveis analisadas no PCC que minimizam o valor da tensão superficial são:

CMM = 106,4 g/L de melão de soja.

CPA = 3,8 g/L de microrganismo.

A partir dos valores obtidos de CMM e CPA que minimizam a resposta, o valor da tensão superficial nesse ponto é de 31,2 mN/m. A condição otimizada apresenta valores próximos aos encontrados na Tabela 4.1 nos experimentos 9, 10 e 11, que são os pontos centrais e os valores mais próximos desta condição, cujos valores encontrados são: 31,7; 32,3 e 30,9 mN/m, respectivamente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor visualização dos efeitos das variáveis analisadas, as concentrações iniciais de melação de soja e de microrganismo, foram construídas superfícies de resposta (Figura 4.24) e curvas de contorno (Figura 4.25).

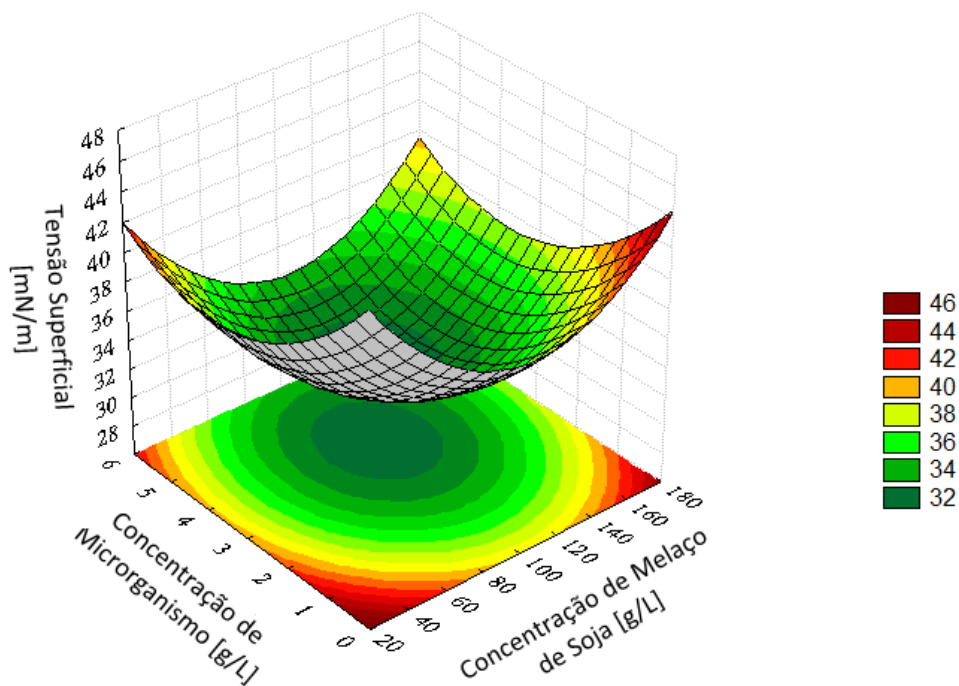


Figura 4.24 - Superfície de resposta para a tensão superficial em relação às variáveis estudadas.

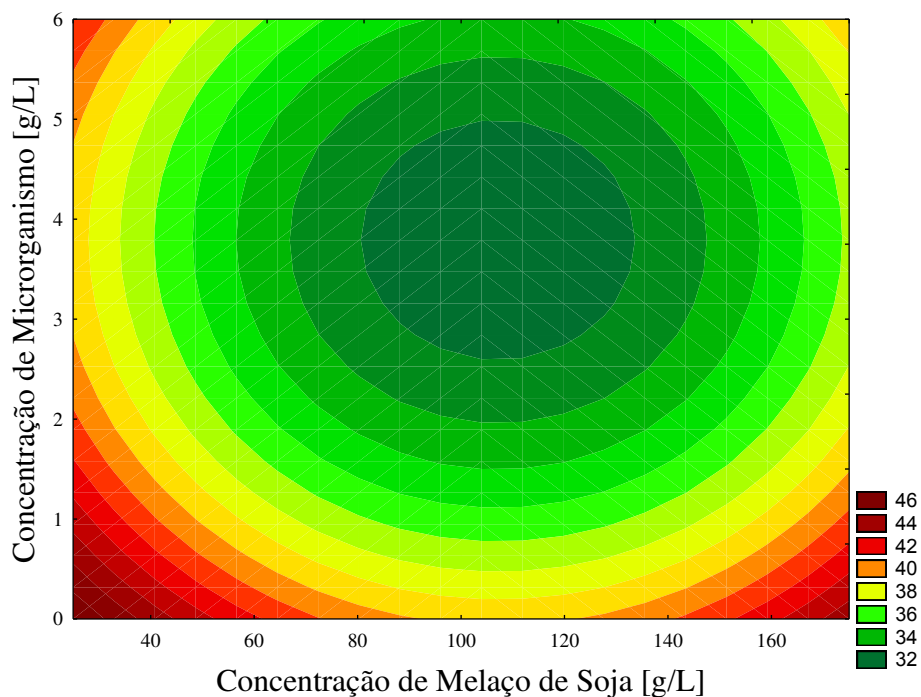


Figura 4.25 - Curvas de contorno para a tensão superficial em relação às variáveis estudadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisar a superfície de resposta e a curva de contorno mostradas nas Figuras 4.24 e 4.25, respectivamente, observa-se que a faixa ótima para minimizar a resposta tensão superficial está entre 85,0 e 135,0 g/L de concentração de melão de soja e 2,5 e 5,0 g/L de concentração inicial de microrganismo.

### 4.3.2 - Índice de emulsificação

Para o índice de emulsificação, foi observado na da Figura 4.26 no digrama de Pareto, que as variáveis concentração inicial de microrganismo ( $X_2$ ) e a concentração de melão de soja ( $X_1$ ) influenciam na resposta índice de emulsificação.

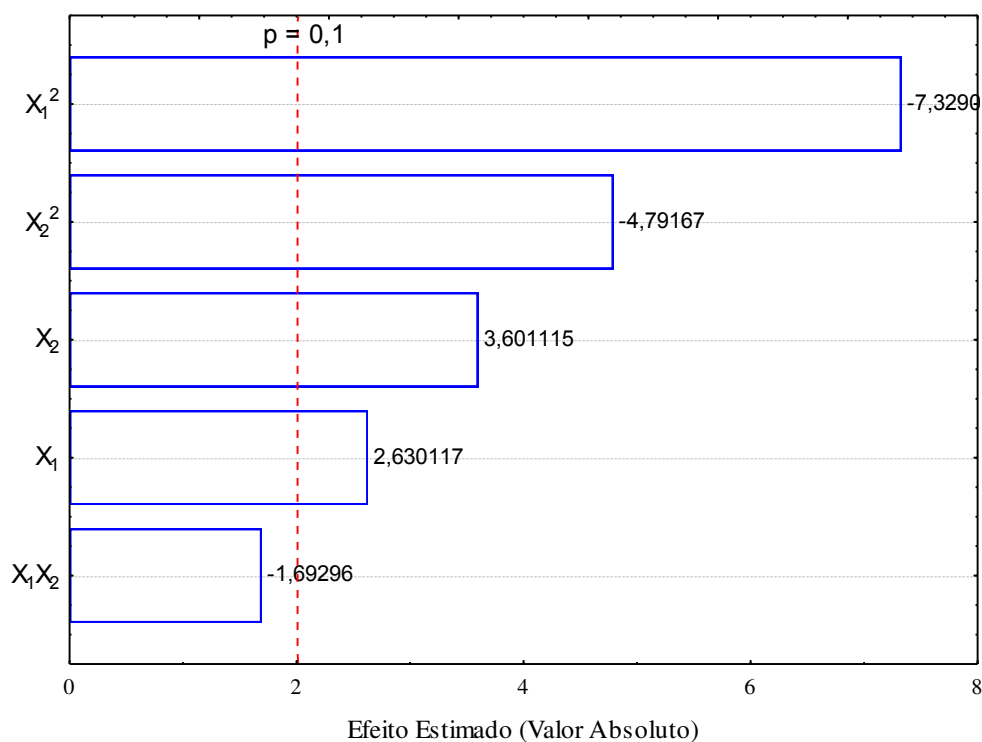


Figura 4.26 - Diagrama de Pareto em relação às variáveis estudadas para o índice de emulsificação.

A Equação 4.2 mostra o modelo ajustado após análise dos dados no programa *STATISTICA* para a resposta índice de emulsificação.

$$IE = 95,26 + 0,66X_1 - 2,20X_1^2 + 0,91X_2 - 1,44X_2^2 \quad (4.2)$$

Desta forma, o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,94 indicando que cerca de 94% dos dados experimentais se ajustam ao modelo proposto. Os valores positivos  $X_1$



## ***RESULTADOS E DISCUSSÃO***

---

e  $X_2$  mostram que concentrações iniciais mais altas de melão de soja e de microrganismo aumentam a resposta índice de emulsificação.

A Figura 4.27 mostra a distribuição dos resíduos em relação aos valores preditos pelo modelo. O comportamento dos resíduos girou em torno de zero e sem tendências o que indica variância constante para todos os valores da resposta, não apresentando erros sistemáticos envolvidos nos experimentos.

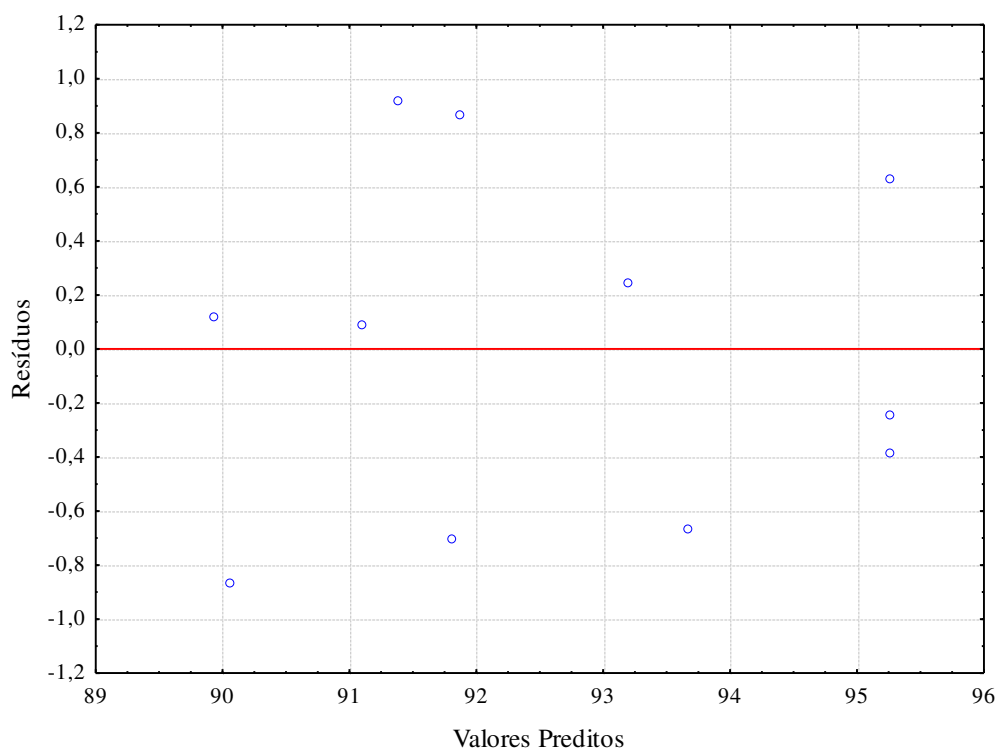


Figura 4.27 - Distribuição dos resíduos relativos ao índice de emulsificação.

Pode-se afirmar que o modelo é apropriado para a análise dos dados, como mostrado na Figura 4.28, dado que é notável a distribuição dos valores observados em torno dos valores preditos.

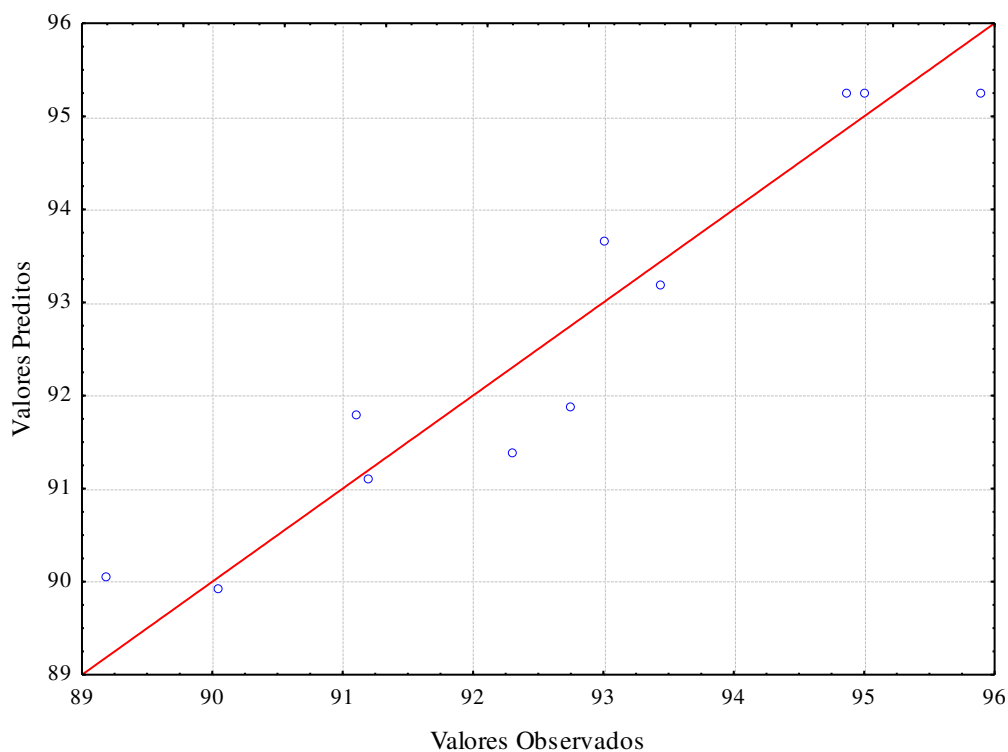


Figura 4.28 - Valores preditos em função dos valores observados relativos ao índice de emulsificação.

A partir da Eq/uação 4.2 e com o auxílio do *software Maple 9.5* o ponto estacionário foi calculado para o índice de emulsificação. Os valores obtidos foram  $\lambda_1 = -2,304$  e  $\lambda_2 = -1,336$ . Estes valores indicam que há um ponto de máximo para a resposta índice de emulsificação, uma vez que os sinais de  $\lambda$ 's são iguais e negativos. Desta forma, calculou-se também os valores de  $X_1$  e  $X_2$  que maximizam a resposta, sendo  $X_1 = 0,110$  e  $X_2 = 0,293$ .

Assim, ao substituir os valores de  $X_1$  e  $X_2$  nas equações codificadas apresentadas pelas Equações 3.2 e 3.3, tem-se que os valores reais das concentrações iniciais das variáveis analisadas no PCC que maximizam o índice de emulsificação são:

CMM = 105,5 g/L de melaço de soja.

CPA = 3,6 g/L de microrganismo.

A partir dos valores obtidos de CMM e CPA que maximizam a resposta, o índice de emulsificação nesse ponto é de 95,5%. A condição otimizada apresenta valores próximos aos encontrados na Tabela 4.1 nos experimentos 9, 10 e 11, que são os pontos centrais e os valores mais próximos desta condição, cujos valores encontrados são: 94,9; 95,0 e 95,9%, respectivamente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor visualização dos efeitos das variáveis analisadas, as concentrações iniciais de melão de soja e de microrganismo, foram construídas superfícies de resposta (Figura 4.29) e curvas de contorno (Figura 4.30).

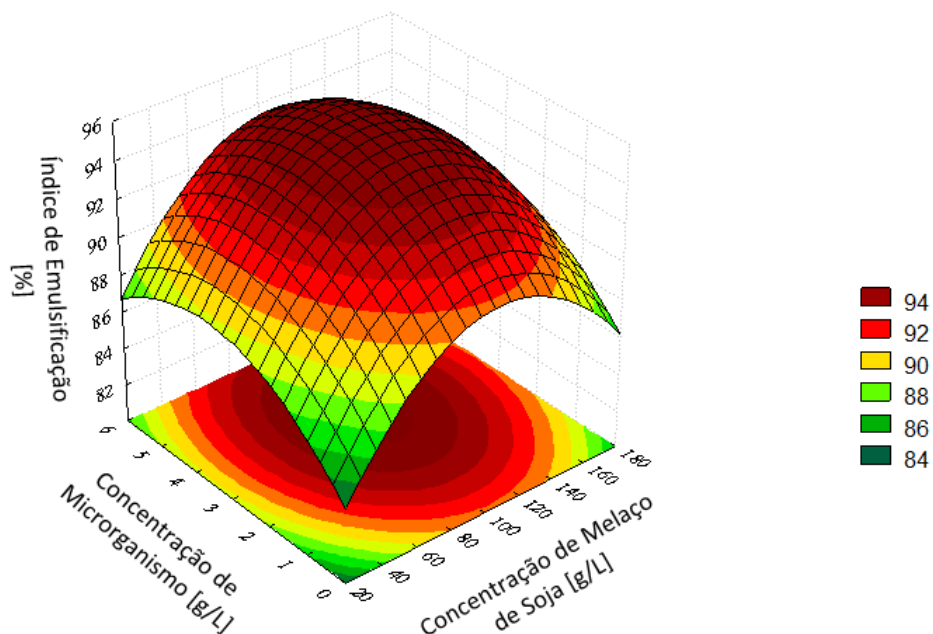


Figura 4.29 - Superfície de resposta para o índice de emulsificação em relação às variáveis estudadas.

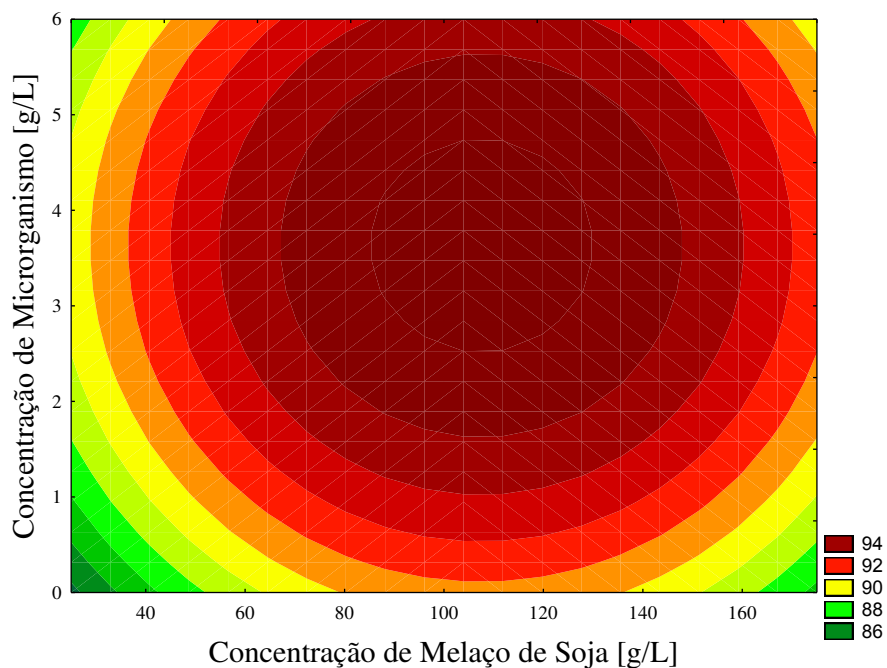


Figura 4.30 - Curvas de contorno para o índice de emulsificação em relação às variáveis estudadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisar a superfície de resposta e a curva de contorno mostradas nas Figuras 4.29 e 4.30, respectivamente, observa-se que a faixa ótima para maximizar o índice de emulsificação está entre 90,0 e 130,0 g/L de concentração de melão de soja e 2,5 e 4,5 g/L de concentração inicial de microrganismo.

### 4.3.3 - Concentração de Raminose

A Figura 4.31 apresenta o diagrama de Pareto, com a análise da resposta concentração de raminose ao longo do tempo de fermentação. Esta resposta foi influenciada principalmente pela concentração de melão de soja ( $X_1$ ), seguida pela concentração inicial de microrganismo ( $X_2$ ).

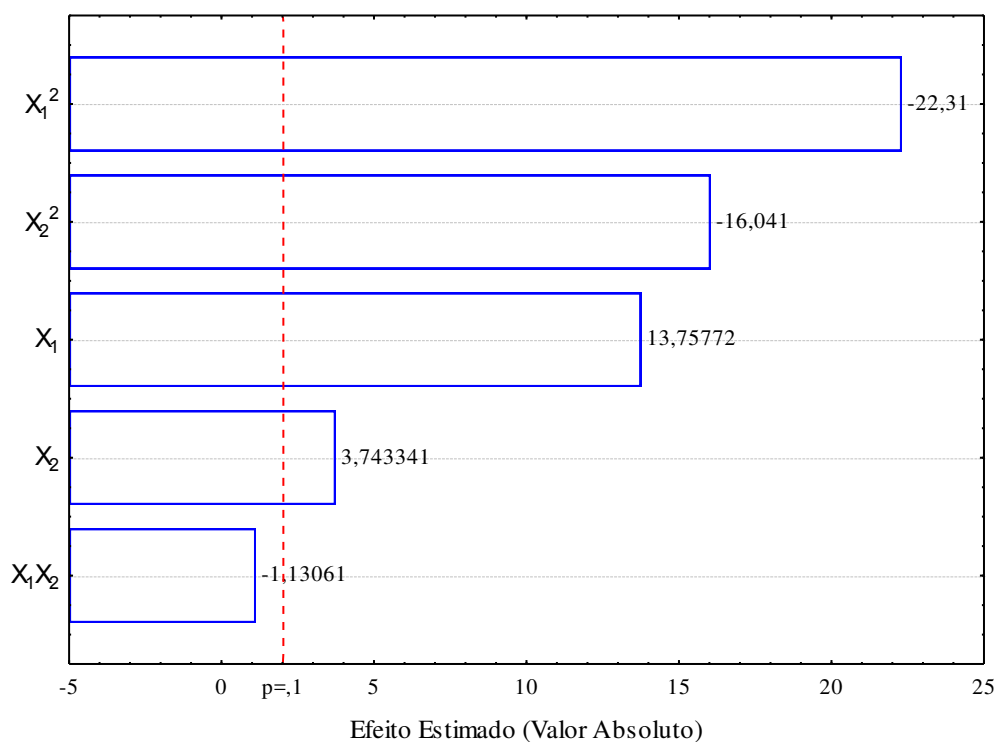


Figura 4.31 - Diagrama de Pareto em relação às variáveis estudadas para a concentração de raminose.

A Equação 4.4 mostra o modelo ajustado para a resposta concentração de raminose.

$$RM = 7,52 + 1,03X_1 - 1,99X_1^2 + 0,28X_2 - 1,43X_2^2 \quad (4.4)$$

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) apresentou o valor de 0,99, sugerindo que cerca de 99% dos dados experimentais se ajustam ao modelo. Os valores positivos de  $X_1$  e  $X_2$  mostram

## ***RESULTADOS E DISCUSSÃO***

---

que concentrações iniciais mais altas de melão de soja e de microrganismo promovem maiores valores para a concentração de raminose.

A Figura 4.32 mostra a distribuição dos resíduos em relação aos valores preditos pelo modelo. O comportamento dos resíduos girou em torno de zero e sem tendências o que indica variância constante para todos os valores da resposta.

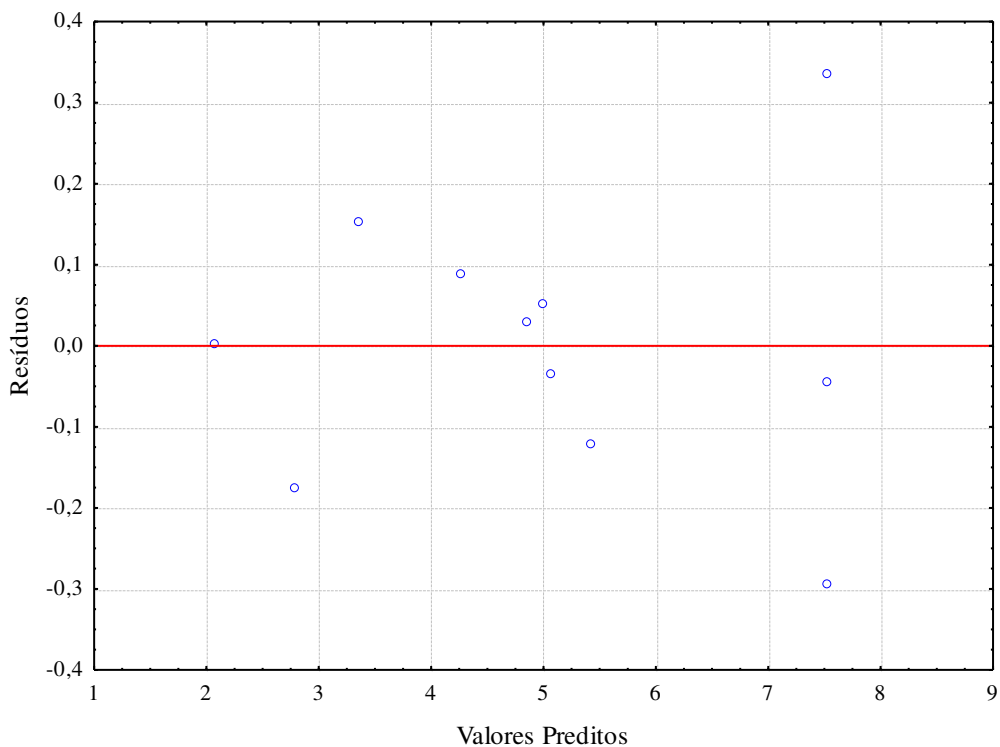


Figura 4.32 - Distribuição dos resíduos relativos à concentração de raminose.

A Figura 4.33 mostra a distribuição dos valores preditos em função dos valores observados, nela é possível notar a proximidade dos valores observados com os valores preditos. O que verifica que o modelo é apropriado para a análise dos dados.

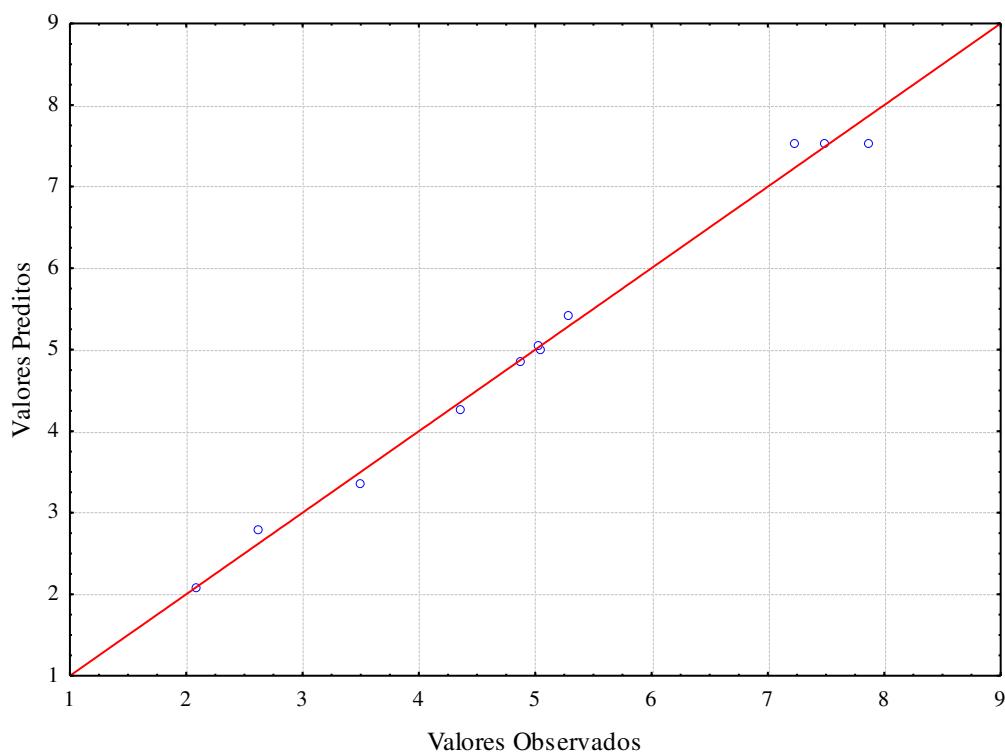


Figura 4.33 - Valores preditos em função dos valores observados relativos à concentração de raminose.

A partir da Equação 4.4 e com o auxílio do *software Maple 9.5* o ponto estacionário foi calculado para a concentração de raminose no meio. Os valores obtidos foram  $\lambda_1 = -1,996$  e  $\lambda_2 = -1,424$ . Estes valores indicam que há um ponto de máximo para a concentração de raminose, dado que os sinais de  $\lambda$ 's são iguais e negativos. Desta forma, calculou-se também os valores de  $X_1$  e  $X_2$  que maximizam a resposta, sendo  $X_1 = 0,256$  e  $X_2 = 0,087$ .

Assim ao substituir os valores de  $X_1$  e  $X_2$  nas equações codificadas apresentadas pelas Equações 3.2 e 3.3, tem-se que os valores reais das concentrações iniciais das variáveis analisadas no PCC que maximizam a concentração de raminose são:

CMM = 112,8 g/L de melão de soja.

CPA = 3,2 g/L de microrganismo.

A partir dos valores obtidos de CMM e CPA que maximizam a resposta, a concentração de raminose nesse ponto é de 7,7 g/L. A condição otimizada apresenta valores próximos aos encontrados na Tabela 4.1 nos experimentos 9, 10 e 11, que são os pontos centrais e os valores mais próximos desta condição, cujos valores encontrados são: 7,9; 7,5 e 7,2 g/L, respectivamente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor visualização dos efeitos das variáveis analisadas, as concentrações iniciais de melação de soja e de microrganismo, foram construídas superfícies de resposta (Figura 4.34) e curvas de contorno (Figura 4.35).

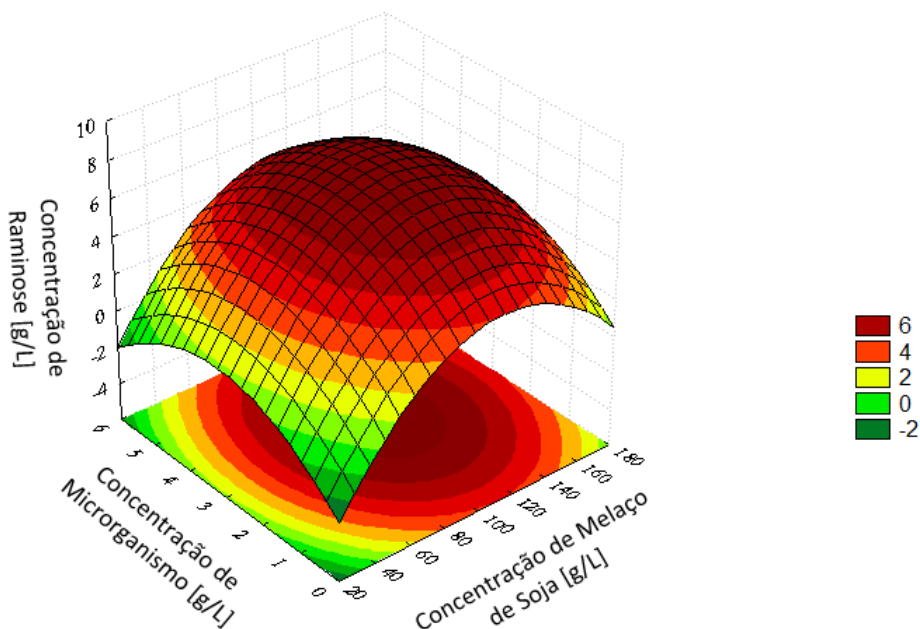


Figura 4.34 - Superfície de resposta para a concentração de ramnose em relação às variáveis estudadas.

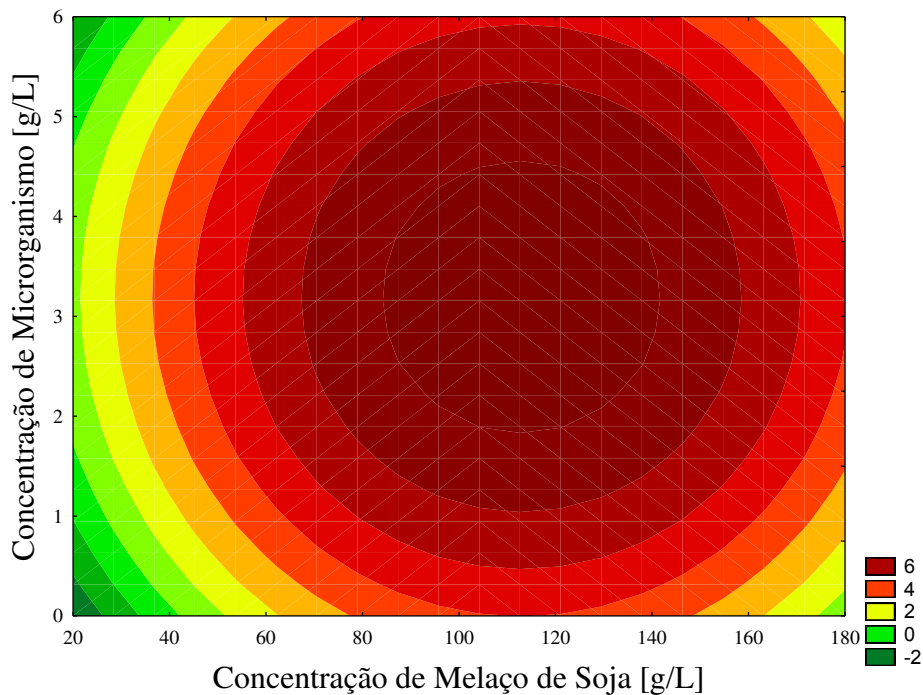


Figura 4.35 - Curvas de contorno para a concentração de ramnose em relação às variáveis estudadas

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisar as figuras anteriores, tem-se que a faixa ótima para a concentração de raminose está entre 85,0 e 140,0 g/L de concentração inicial de melão de soja e 1,8 e 4,5 g/L de concentração inicial de microrganismo.

### 4.3.4 - Concentração de Biossurfactantes

No diagrama de Pareto da Figura 4.36 mostrou que, a resposta concentração de biossurfactante foi influenciada principalmente pela concentração de melão de soja ( $X_1$ ) no meio fermentativo. A variável concentração inicial de microrganismo ( $X_2$ ) também influenciou, porém em menor escala quando comparada à concentração de melão.

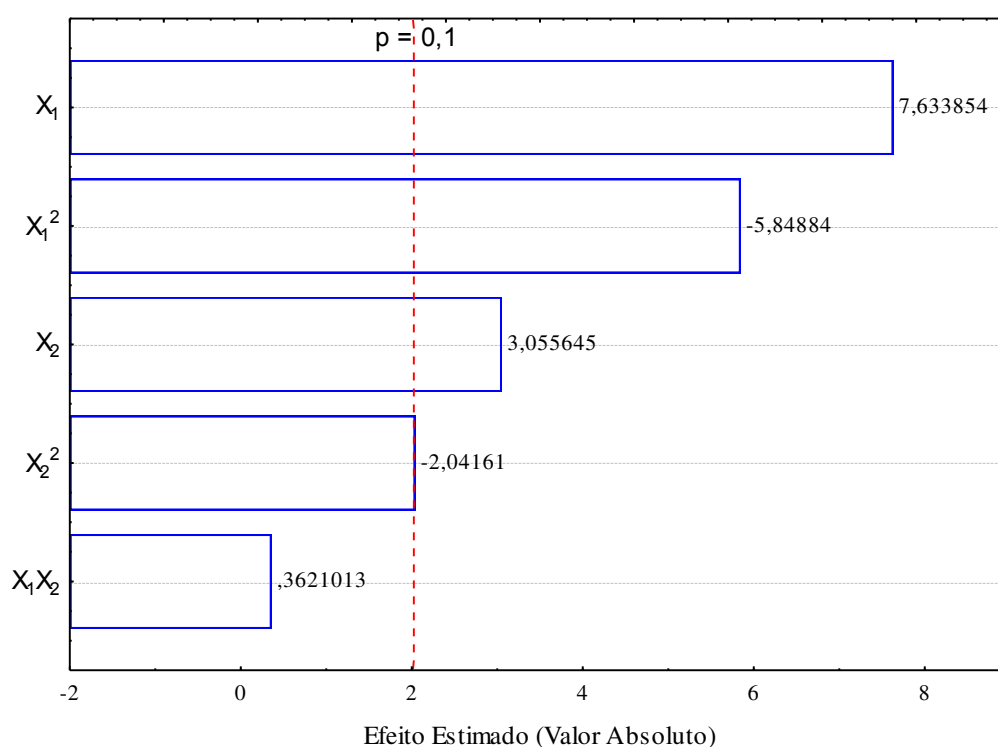


Figura 4.36 - Diagrama de Pareto em relação às variáveis estudadas para a concentração de biossurfactante.

A Equação 4.5 mostra o modelo ajustado para a resposta concentração de biossurfactante.

$$CB = 11,45 + 1,98X_1 - 1,80X_1^2 + 0,79X_2 - 0,63X_2^2 \quad (4.5)$$

O valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,95, o que indica que cerca de 95% dos dados experimentais se ajustam ao modelo. Os valores positivos de  $X_1$  e  $X_2$  mostram que



## ***RESULTADOS E DISCUSSÃO***

---

concentrações iniciais mais altas de melão de soja e de microrganismo promovem maiores concentrações de biossurfactante.

A Figura 4.37 mostra a distribuição dos resíduos em relação aos valores preditos pelo modelo. O comportamento dos resíduos girou em torno de zero e sem tendências o que indica variância constante para todos os valores da resposta.

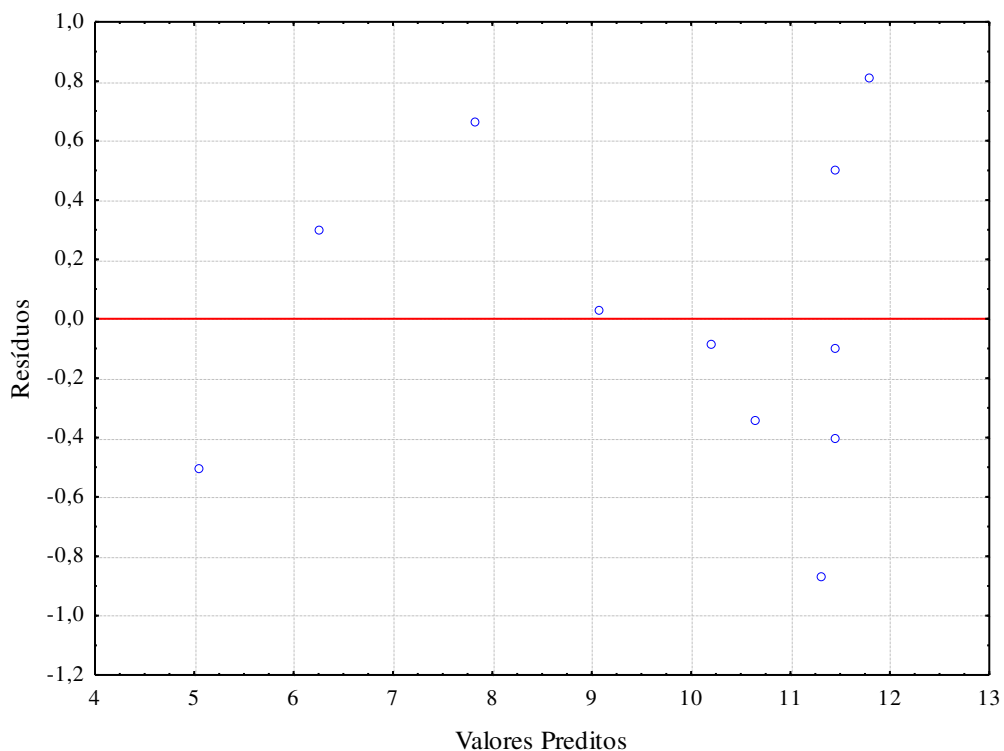


Figura 4.37 - Distribuição dos resíduos relativos à concentração de biossurfactante.

A Figura 4.38 mostra a distribuição dos valores preditos em função dos valores observados, nela é possível notar a proximidade dos valores observados com os valores preditos. O que verifica que o modelo é apropriado para a análise dos dados.

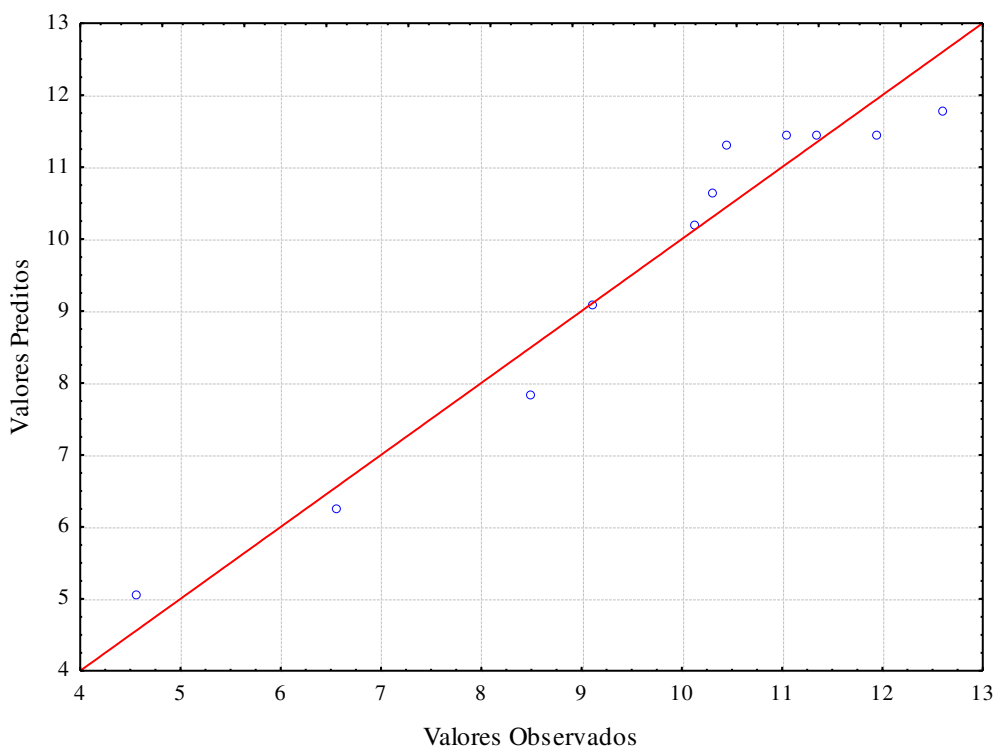


Figura 4.38 - Valores preditos em função dos valores observados relativos à concentração de biossurfactante.

A partir da Equação 4.5 e com o auxílio do *software Maple 9.5* o ponto estacionário foi calculado para a concentração de biossurfactante. Os valores obtidos foram  $\lambda_1 = -1,804$  e  $\lambda_2 = -0,626$ . Estes valores indicam que há um ponto de máximo para a concentração de biossurfactante devido aos sinais de  $\lambda$ 's serem iguais e negativos. Desta forma, calculou-se também os valores de  $X_1$  e  $X_2$  que maximizam a resposta, sendo  $X_1 = 0,575$  e  $X_2 = 0,686$ .

Assim ao substituir os valores de  $X_1$  e  $X_2$  nas equações codificadas apresentadas pelas Equações 3.2 e 3.3, tem-se que os valores reais das concentrações iniciais das variáveis analisadas no PCC que maximizam a concentração de biossurfactante são:

CMM = 128,8 g/L de melão de soja.

CPA = 4,4 g/L de microrganismo.

A partir dos valores obtidos de CMM e CPA que maximizam a resposta, o valor da concentração de biossurfactante nesse ponto é de 11,8 g/L. Para melhor visualização dos efeitos das variáveis analisadas, as concentrações iniciais de melão de soja e de microrganismo, foram construídas superfícies de resposta (Figura 4.39) e curvas de contorno (Figura 4.40).

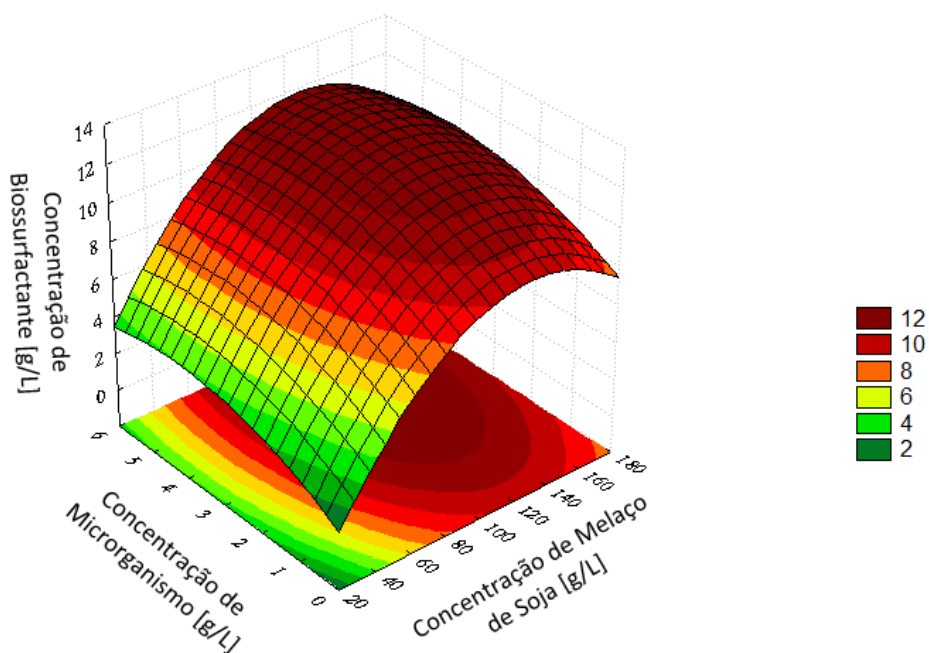


Figura 4.39 - Superfície de resposta para a concentração de biosurfactante em relação às variáveis estudadas.

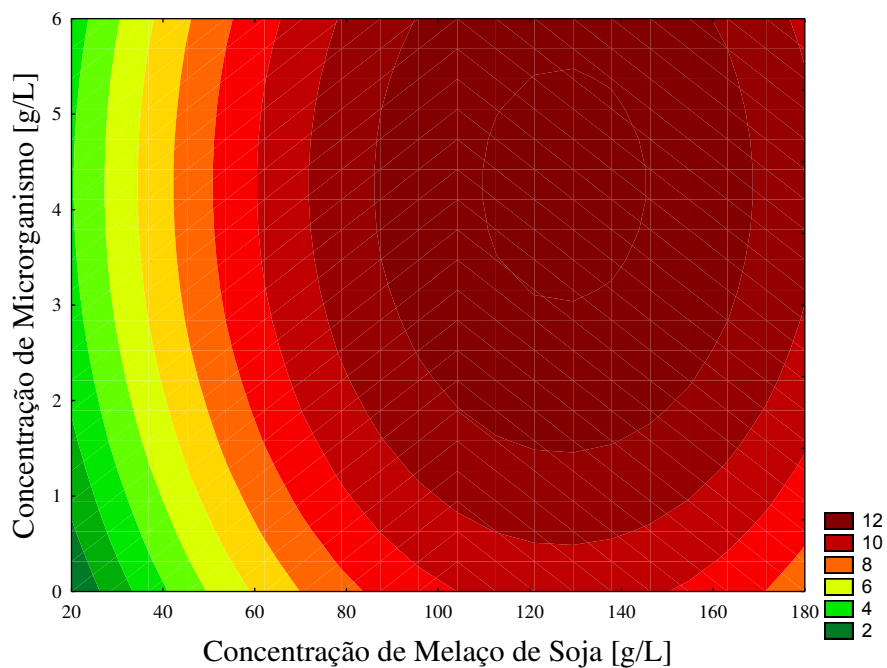


Figura 4.40 - Curvas de contorno para a concentração de biosurfactante em relação às variáveis estudadas

Com a análise das Figuras 4.39 e 4.40, respectivamente, observa-se que a faixa ótima para a concentração de biosurfactante está entre 90,0 e 170,0 g/L de concentração inicial de melação de soja e 1,5 e 6,0 g/L de concentração inicial de microrganismo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.4 – Validação do modelo

Ao analisar o comportamento dos experimentos no planejamento composto central, fez-se uma nova fermentação com as condições iniciais dentro das faixas obtidas para cada resposta encontrada. Os valores de cada faixa para as variáveis concentração de meloço de soja no meio fermentativo (CMM) e concentração inicial de meloço de soja (CPA) são encontrados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Valores encontrados para as faixas que otimizam as respostas

Resposta	CMM [g/L]	CPA [g/L]
TS	85,0 – 135,0	2,5 – 5,0
IE	90,0 – 130,0	2,5 – 4,5
RM	85,0 – 140,0	1,8 – 4,5
CB	90,0 – 170,0	1,5 – 6,0

Desta forma, os valores para validar os experimentos foram concentração inicial de meloço de soja de 120 g/L e concentração inicial de microrganismo de 4,0 g/L. Ao substituir esses valores nas equações codificadas 3.2 e 3.3, tem-se  $X_1 = 0,4$  e  $X_2 = 0,5$  e ao substituir os valores codificados nas equações dos modelos tem-se os resultados obtidos para cada resposta. A Tabela 4.3 mostra os resultados obtidos pelo modelo e através do experimento nessas condições, além dos dados obtidos na literatura para comparar os valores. Nela é possível notar que as respostas obtidas pelo experimento de validação se aproximam às do modelo proposto. Os valores obtidos também se assemelham aos encontrados na literatura.

Tabela 4.3 - Dados obtidos pelo experimento de validação do modelo

	TS [mN/m]	IE [%]	RM [g/L]	CB [g/L]
Modelo	31,5	95,1	7,4	12,2
Validação	31,9	97,4	6,9	11,7
Rahman (2002)	25	70	4,31	-
Lima (2007)	26	100	3,26	-
Borges (2011)	27,5	100	3,84	-
Lan <i>et al.</i> (2015)	24,1	59	-	13,93
Deepika <i>et al.</i> (2016)	30,14	83	-	5,90

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 4.41 mostra o comportamento das respostas analisadas ao longo do tempo, o gráfico foi obtido com o auxílio do *Software Origin Graph 8.0*. Os resultados apresentados mostram que após 48 horas de fermentação as respostas tensão superficial (TS), índice de emulsificação (IE), concentração de raminose (RM) e concentração de biossurfactante (CB) tiveram pouca variação ou mantiveram-se constantes. Já a resposta biomassa (BM) mostra que o crescimento celular ocorreu até as 24 horas, desta forma, nota-se que o biossurfactante está associado parcialmente ao crescimento celular.

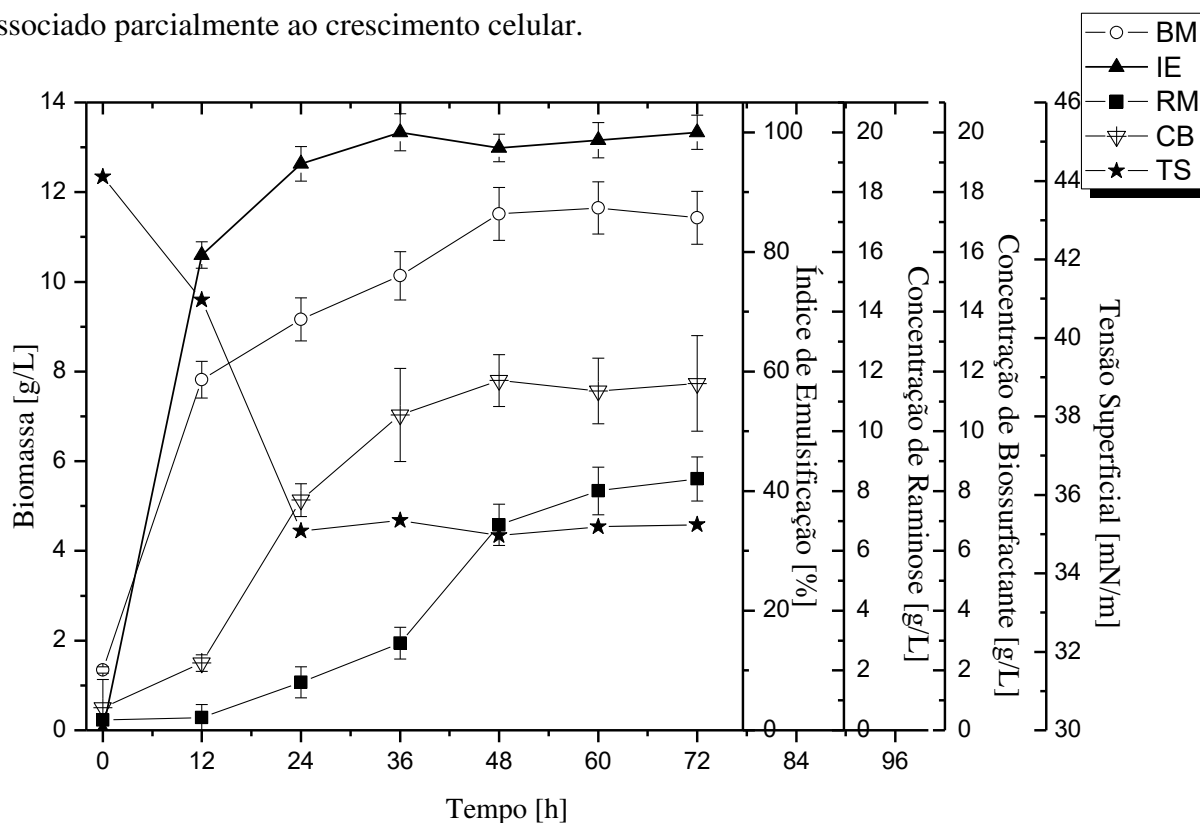


Figura 4.41 – Cinética das respostas estudadas ao longo do tempo de fermentação.

### 4.4.1 – Quantificação de açúcar

A quantificação de açúcares realizadas pela cromatografia líquida de alto desempenho é mostrada na Figura 4.42. O maior consumo dos açúcares presentes foi o de sacarose, o que pode estar associado também à sua decomposição em glicose e frutose. Os outros açúcares como estaquiose, rafinose e glicose variaram pouco ou mantiveram-se constantes ao longo do tempo.

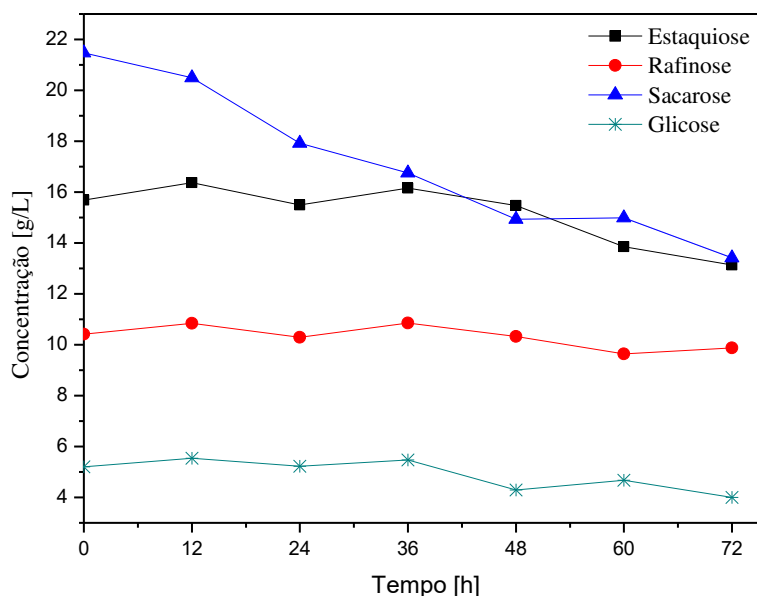


Figura 4.42 - Concentração de açúcares ao longo do tempo do experimento de validação em 48 horas de produção.

### 4.4.2 – Extração de gordura por Soxhlet

A quantidade de gordura presente no meio inicial e com 48 horas, utilizando a Equação 3.4, foram de 3,7% e 0,6%, respectivamente. Considerando que o meio possuía 120 g/L de melaço de soja, a quantidade inicial de 3,7% é coerente com o obtido pelo método de Bligh-Dyer para a amostra pura. Desta forma, o consumo de lipídeos ao longo de 48 horas de fermentação foi de 84,5%.

### 4.4.3 – Teor de carbono e nitrogênio

O teor de carbono total e nitrogênio total é mostrado na Figura 4.43 onde é possível notar o consumo ao longo do tempo. O carbono possuía concentração inicial de 22.000 mg/L e decaiu com o tempo atingindo valores próximos a 16.000 mg/L o que representa um consumo de cerca de 28% do carbono total disponível. O nitrogênio teve comportamento parecido ao do carbono, concentração inicial próxima a 1.550 mg/L e final de 1.150 mg/L, tendo consumido aproximadamente de 26%.

Ao comparar as Figuras 4.42 e 4.43, foi possível observar que o carbono consumido pelas bactérias *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-10145 pode estar atrelado ao consumo, principalmente de sacarose. Outra perda significativa de carbono pode ser atribuída ao consumo de lipídeos presentes no melaço de soja, dado que pela análise de extração por Soxhlet o consumo foi de 84,5% do valor inicial de lipídeos presente no meio fermentativo.

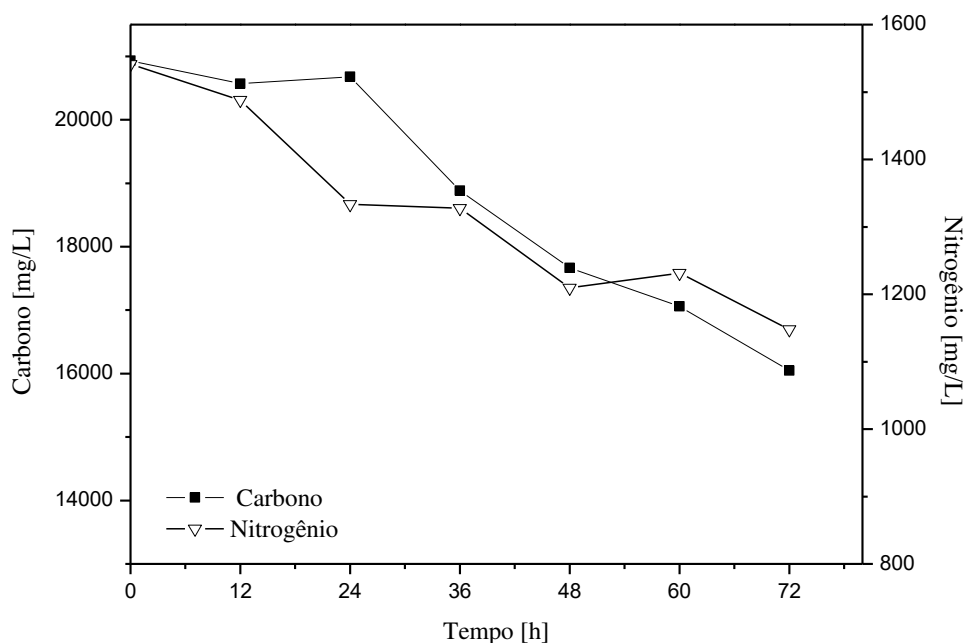


Figura 4.43 – Análise do consumo de carbono total e nitrogênio total do experimento de validação em 48 horas de produção.

#### 4.4.4 – Concentração micelar crítica (CMC)

O comportamento da concentração micelar crítica do meio produzido após 48 horas é demonstrada pela Figura 4.44, sendo que o resultado de 80 mg/L foi encontrado no ponto de inflexão da curva. O valor de 80 mg/L está de acordo com o encontrado na literatura. Segundo relataram Benincasa *et al.* (2004) a concentração necessária para se obter a concentração micelar crítica é de 1 a 2000 mg/L de biossurfactante. Estudos mais recentes apontam valores próximos ao encontrado, Lan *et al.* (2015) encontraram 22 mg/L de CMC em um raminolipídeo com uso de *Pseudomonas* SWP-4, e fonte de carbono óleo de cozinha usado. Deepika *et al.* (2016) acharam 100 mg/L de CMC em raminolipídeo a partir de *Pseudomonas aeruginosa* KVD-HR42 e como fonte de substrato óleo de semente de karanja e Ma *et al.* (2016) obtiveram CMC de 50 mg/L utilizando óleo de palma e nitrato de sódio a partir de estirpes de *Pseudomonas aeruginosa*.

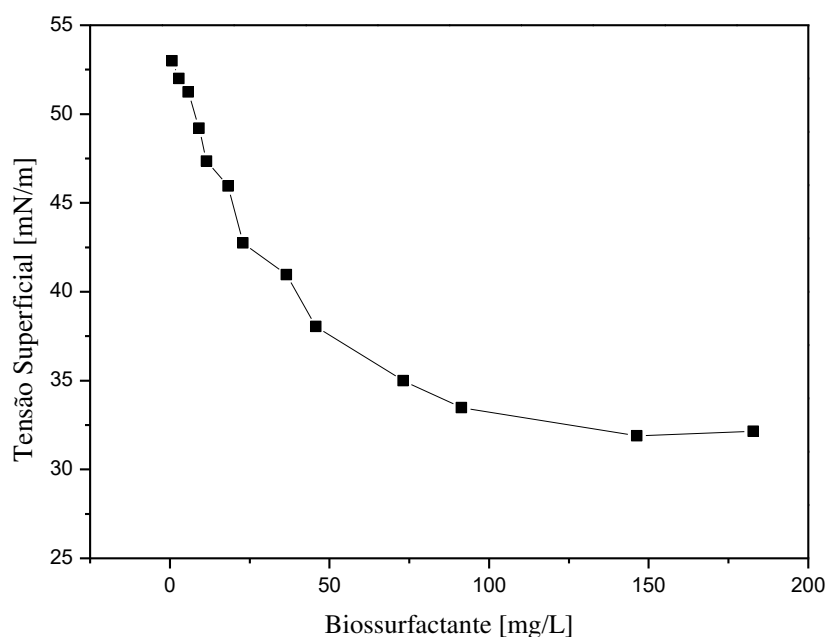


Figura 4.44 – Concentração micelar crítica do experimento de validação em 48 horas de produção.

#### 4.4.5 – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

A Figura 4.45 mostra o espectro na região do infravermelho, para o biossurfactante produzido. Nela, é possível observar as principais bandas de absorção: região de estiramento axial entre 3200 e 3400  $\text{cm}^{-1}$  devido as ligações hidroxilas O-H; estiramento axial de C-H alifáticos ( $\text{CH}_3$  e/ou  $\text{CH}_2$ ) em torno de 2950  $\text{cm}^{-1}$ ; a presença de bandas em 1642  $\text{cm}^{-1}$  pode estar ligada à presença de peptídeos e proteínas contidas no melão de soja; deformação angular C=O em 1450  $\text{cm}^{-1}$ ; deformação angular de C-H em 1381  $\text{cm}^{-1}$ ; estiramento C-O-C (éter) em 1254  $\text{cm}^{-1}$  confirmando a presença de ligações formadas entre o átomo de carbono e os grupos hidroxila nas estruturas químicas dos anéis de raminose e estiramento de O-H próximo a 1050  $\text{cm}^{-1}$ .

As bandas encontradas são características de glicolipídeos relatados na literatura (PRABAKARAN *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2014; DEEPIKA *et al.*, 2015; DWIVEDI *et al.*, 2015). Desta forma, é possível afirmar que o biossurfactante produzido pertence ao grupo dos glicolipídeos e, possivelmente à classe dos raminolipídeos.



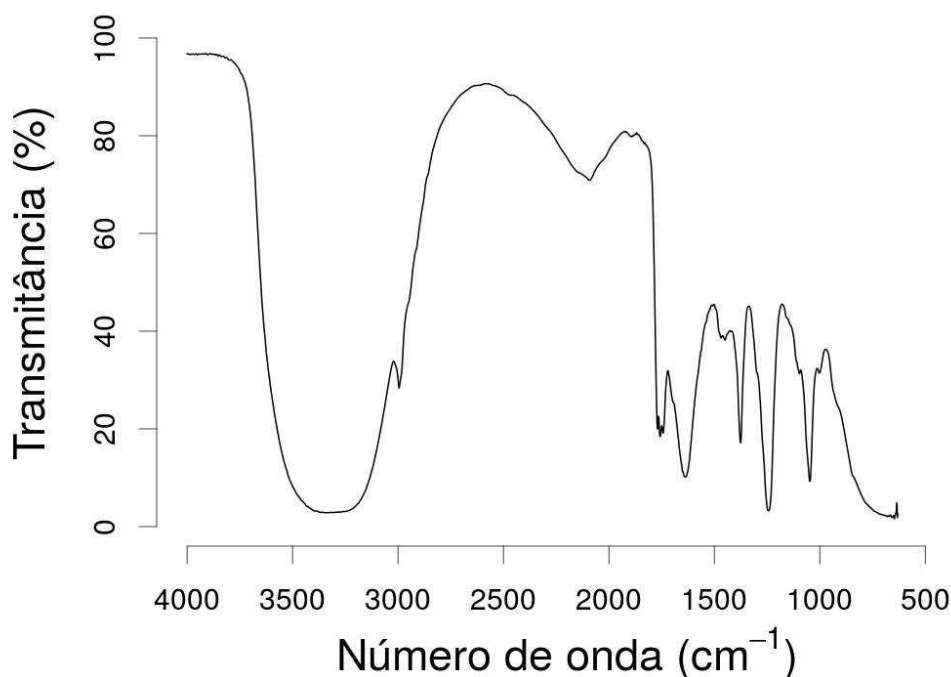


Figura 4.45 – Espectroscopia do Infravermelho para o biossurfactante produzido em 48 horas.

#### **4.5 – Teste em reator**

As Figuras 4.46 e 4.47 apresentaram os resultados obtidos com produção em reator, o crescimento celular se deu de forma exponencial e maior que o obtido nos experimentos anteriores, obtendo até 19,4 g/L que pode ser atribuído ao oxigênio fornecido pela aeração aos microrganismos. Já a concentração de biossurfactante foi significativamente menor quando comparada com o experimento de validação, o reator produziu 5,7 g/L e o experimento anterior 11,7 g/L. O reator apresentou emulsões estáveis obtendo 100% de emulsificação ao término das 48 horas de fermentação e a tensão superficial diminuiu de 46 mN/m para 29 mN/m já em 36 horas de fermentação. Os resultados obtidos do experimento em reator se mostram promissores para otimizar a produção na condição obtida pelo planejamento composto central, estudos mais aprofundados e experimentos se fazem necessários para verificar a melhor condição de agitação e aeração que otimizem a produção de biossurfactantes.

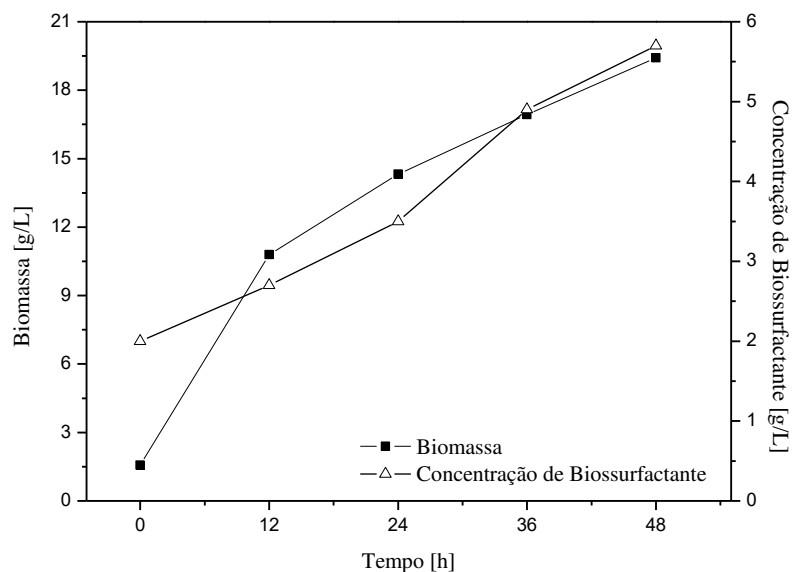


Figura 4.46 – Biomassa e concentração de biossurfactante ao longo do tempo para *Pseudomonas aeruginosa* 10145, pH 7,0, reator com agitação de 310 rpm e aeração de 1,2 vvm, concentração de 120 g/L de melação de soja e 4,0 g/L de microrganismos.

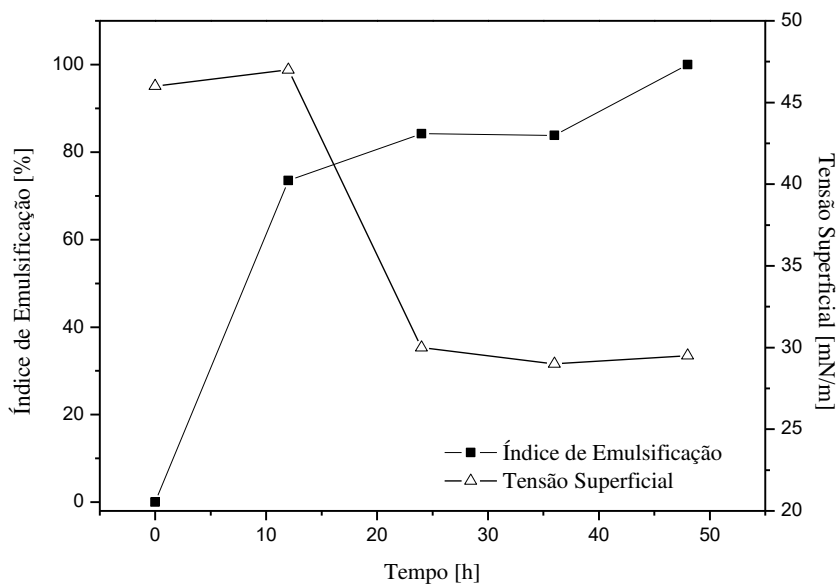


Figura 4.47 - Tensão superficial e índice de emulsificação ao longo do tempo para *Pseudomonas aeruginosa* 10145, pH 7,0, reator com agitação de 310 rpm e aeração de 1,2 vvm, concentração de 120 g/L de melação de soja e 4,0 g/L de microrganismo.

---

---

## 5 - CONCLUSÃO

---

---

### 5.1 - Conclusão

A partir dos resultados obtidos neste trabalho foi possível notar as seguintes conclusões:

- A linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* 10145 apresentou potencial para a produção de biossurfactante;
- O melão de soja se mostrou uma boa fonte de carbono para a produção de biossurfactante;
- A otimização da resposta mostrou que os melhores resultados são obtidos com concentrações de melão de soja entre 100,0 e 130,0 g/L e concentração inicial de microrganismo entre 3,0 e 4,5 g/L;
- Os experimentos, em sua maioria, apresentaram emulsões estáveis após 24 horas;
- A partir das condições otimizadas, a validação dos experimentos dentro da faixa ótima apresentou 97,4% de emulsificação, 6,9 g/L de raminose, 11,7 g/L de biossurfactante, tensão superficial de 31,9 mN/m e concentração micelar crítica de 80,0 mg/L;
- Os resultados do modelo proposto pelo planejamento composto central apresentaram-se próximos aos obtidos pelo experimento de validação.

### 5.2 - Sugestões para trabalhos futuros

- Avaliar a utilização de coculturas de microrganismos para a produção de biossurfactantes a partir de melão de soja;
- Otimizar a produção de biossurfactante em reator avaliando as variáveis aeração e agitação, com controle de temperatura e pH do meio;
- Aplicar o biossurfactante produzido em processos de biorremediação.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABIOVE – Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. Abiove – Soja em grão e farelo: recorde de exportações em março e no 1º trimestre – nota à imprensa. Disponível em: <[www.abiove.org.br/site/\\_FILES/Portugues/07042016-121055-07\\_04\\_2016\\_--estatisticas\\_exp..pdf](http://www.abiove.org.br/site/_FILES/Portugues/07042016-121055-07_04_2016_--estatisticas_exp..pdf)> acesso em 05 de maio de 2016.

ABYANEH, A. S.; FAZAELIPOOR, M. H. Evaluation of rhamnolipid (RL) as a biosurfactant for the removal of chromium from aqueous solution by precipitate flotation. Journal of Environmental Management. v. 165, p. 184-187, 2016.

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

BANAT, I. M. Biosurfactants, more in demand than ever. Biofutur., v. 198, n. 20, p. 44-47, 2000.

BANAT, I. M., FRANZETTI, A., GANDOLFI, I., BESTETTI, G., MARINOTTI, M. G., FRACCHIA, L., SMYTH, T. J., MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potencial. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 87, p. 427-444, 2010.

BARTOLOMAI, A. Fábricas de alimentos, processos, equipamentos, custos. Zafagoza: Ed. Acriba S.A., 293p., 1987.

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

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

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BNDES – Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social. Potencial de diversificação da indústria química Brasileira. Relatório 4 – Tensoativos. Rio de Janeiro, 2014, 52 p. Disponível em <[www.bndes.gov.br](http://www.bndes.gov.br)> acesso em 05 de maio de 2016.

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

BORGES, W. S. Produção de biossurfactante de efluentes gordurosos gerados por abatedouros e frigoríficos. Dissertação de mestrado, UFU, 2011, 106p.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. Statistic for experiments. An introduction to design, data analysis and model building. New York; Wiley, 1978.

BRADY, J. E.; HUMISTON, G. E. Química Geral. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1ª ed., 1981.

CHAJUSS, D. Soy protein concetrare: technology, properties, and applications. In: LIU, K. Soybeans as Functional Foods and Ingredients, Illinois: AOCS Press, cap. 6, 2004.

CHEN, S. Y., WEI, Y. H., CHANG, J. S. Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenou *Pseudomonas aeruginosa* S2. Applied Microbol. Biotechnol., v. 1, p. 67-74, 2007.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agentes two *Bacillus* species. Applied and Enviromental Microbiology, v. 42, p. 224-229, 1987.

DEEPIKA, K. V; SRIDHAR, P. R.; BRAMHACHARI, P. V. Characterization and antifungal properties of rhamnolipids produced by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain KVD-HM52. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 4, p. 608-615, 2015.

DEEPIKA, K. V.; KALAM, S.; SRIDHAR, P. R.; PODILE, A. R.; BRAMHACHARI, P. V. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KVD-HR42 using response surfasse methodology. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 5, p. 38-47, 2016.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production os surfactant and their comercial potential. Microbiol. Mol. Biol. R., v. 61, p.47-64, 1997.

DÉZIEL, E.; LEPINE, F.; DEMRIE, D.; BOISMEN, D.; MAMER, O. A.; VILLEMUR, R. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on manitol or naphthalene. Biochemical et Biophysical Acta, v. 1440, p. 244-252, 1999.

DWIVEDI, S.; SAQUIB, Q.; AL-KHEDHAIRY, A. A.; AHMAD, J.; SIDDIQUI, M. A.; MUSARRAT, J. Rhamnolipids functionalized AgNPs-induced oxidative stress and modulation of toxicity pathway genes in cultures MCF-7 cells. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 132, p. 290-298, 2015.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/historia>> acesso em 07 de dezembro de 2015.

FERNANDES JUNIOR, C. C. Integração Energética Etapa de Extração de Óleo de Soja, Utilizando a Análise Pinch. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2009, 80 p.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

FLEURACKERS, S. J. J. On the Use of Waste Frying Oil in The Synthesis of Sophorolipids. Europe Jornal Lipid Science and technology, v. 108, p. 5-12, 2006.

GREEK, B. F. Detergent Industry Ponders Product for New Decade. Chemical Engineering News, v. 68, p. 37-38, 1990.

HOLMBERG, K. Natural Surfactants. Curent Opinion in Colloid and Interface Science, v. 6, p. 148-159, 2001.

HOU, H. J.; CHANG, K. C. Yield and quality of soft tofu as affected by soybean physical damage and storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Chicago, v.116, p.4798-4805, 1998.

HU, Y.; JU, L. K. Purification of lactonic sophorolipids by crystallization. J. Biotechnol., v. 87 (3), p. 263-272, 2001.

JOHNSON, L.A., MYERS, D.J., BURDEN, D.J. Soy Protein's History. Prospectis in Food, Feed. Inform 3:429-444, 1992.

JUNIOR, W. G. M. Produção de lipase por *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* empregando melaço de soja. Dissertação de Mestrado, UFU, 2013, 112p.

KAKINUMA, A.; OACHIDA, A.; SHINA, T.; SUGINO, H.; ISANO, M.; TANURA, G.; ARIMA, K. Confirmation of the structure os surfactin by mass spectrometry. Agric. Biol. Chem., v. 31, p. 556-561, 1969.

KAMALI, F. P.; MEUWISSEN, M. P. M.; BOER, I. J. M.; VAN MIDDELAAR, C. E.; MOREIRA, A.; OUDE LANSINK, A. G. J. M. Evaluation of the environmental, economic, and social performance of soybean farming systems in southern Brazil. Journal of Cleaner Production, p. 1-10, 2016.

KARANTH, N. G. K., DEO, P. G., VEENANADIG, N. K. Microbial production of biosurfactants and their importance. Curr. Sci., v.1, p. 116-126, 1999.

KOSARIC, N.; GRAY, N. C. C.; CAIRNS, W. L.; STECHEY, D.; WOOD, J. The role of notrogen in multiorganism strategies for biosurfactan production. JAOCS, v. 64, n. 11, 1987.

KOSARIC, N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. Food Technol. Biotechnol., v. 39, p. 295-304, 2001.

KUYUKINA, M. S.; IVSHINA, I. B.; BAEVA, T. A.; KOCHINA, O. A.; GEIN, S. V.; CHERESHNEV, V. A. Trehalolipid biosurfactants from nonpathogenic *rhodococcus* actinobacteria with diverse immunomodulatory activies. New Biotechnology, v. 32, p. 559-568, 2015.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- LAN, G.; FAN, Q.; LIU, Y.; CHEN, C.; LI, G.; LIU, Y.; YIN, X. Rhamnolipid production from waste cooking oil using *Pseudomonas* SWP-4. Biochemical Engineering Journal, v. 101, p. 44-54, 2015.
- LANG, S.; WAGNER, F. Structure and Properties of Biosurfactants. In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N. C. C. (ed), Biosurfactants and Biotechnonology. New York: Maecel Dekker, p. 21-45, 1987.
- LANG, S.; KATSIWELA, E.; WAGNER, F. Antimicrobial effects of biosurfactants. Fat Sci. Technol., v. 91, p. 363-368, 1989.
- LANG, S. Biological Amphiphiles: Microbial Surfactants. Opinion in Colloid and Interface Science, v. 74, p. 59-70, 2002.
- LIMA, C. J. B.; FRANÇA, F. P.; SÉRVULO, E. F. C.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L. Enhancement of Rhamnolipid Production in Residual Soybean Oil by Isolated Strain of *Pseudomonas aeruginosa*, Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 07, p. 136-140, 2007.
- LIN, S-C. Biosurfactants: Recent Advances. J. Chem. Tech. Biotechnol. 66: 109-120, 1996.
- MA, K. Y.; SUN, M. Y.; DONG, W.; HE, C. Q.; CHEN, F. L.; MA, Y. L. Effects of nutrition optmization strategy on rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* strain DN1 for bioremediation of crude oil. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. v. 6, p. 144-151, 2016.
- MAKULA, R. A.; FINNERTY, W. R. Microbial assimilation of hydrocarborns: cellular distribution of fatty acids. Journal of Bacteriology, v. 112, p. 398-407, 1972.
- MANTOVANI, D. Estudo da recuperação e hidrólise de isoflavonas e carboidratos obtidos a partir do melão de soja (Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, 2013, 144 p.
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>> acesso em 16 de abril de 2016.
- MARKLEY, K.S. Soybean and soybean products. New York: Interscience Publishers, 1974. 2v.
- MESQUITA, A. C. Uso das Técnicas de Oxidação Química e Biodegradação na Remoção de Alguns Componentes Recalcitrantes. Tese de Doutorado, UFRJ, 2004, 158p.
- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEM, R. Towards comercial production of microbial surfactants. Trends Biotechnol., v 24, p. 509-515, 2006.
- MULLIGAN, C. N.; Environmental Applications for Biosurfactants. Environmental Pollution, v. 133, p. 183-198, 2005.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

NIKOLOPOULOU, M.; KALOGERAKIS, N. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers combined with biosurfactants and molasses. Marine Pollution Bulletin. V. 56, p. 1855-1861, 2008.

NISTCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. Revista Química Nova, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

PEKIN, G.; VARDAR-SUKAN, F. KOSARIC, N. Production os Sophorolipids from *Candida bambicola* ATCC22214 Using Turkish Corn Oil and Honey. Engineering Life Science, v. 5, p. 357-362, 2005.

PLOCINICZAK, M. P.; PLAZA, G. A.; SEGET, Z. P.; CAMEOTRA, S. S. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances, Int. J. Mol. Sci., v. 12, p. 633-654, 2011.

POTTER, N. N.; HOTCHIKISS, J. H. Food Science. Ed 5. New York: Ed. Chanpman & Hall, 608p., 1997.

PRABAKARAN, G.; HOTI, S. L.; RAO, H. S. P.; VIJJAPU, S. Di-rhamnolipid is a mosquito pupicidal metabolite from *Pseudomonas fluorescens* (VCRC B426). Acta Tropica, v. 148, p. 24-31, 2015.

QURESHI, N., LOLAS, A., BLASCHEK, H.P. Soy molasses as fermentation substrate for production of butanol using *Clostridium beijerinckii* BA 101. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 26:290-295, 2001.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; McCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipid Biosurfactant Production by Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Using Low-Cost Raw Materials. Biotechnol. Prog., v. 18, p. 1277-1281, 2002.

RAMIRÉZ, I. M.; TSAOUSI, K.; RUDDEN, M.; MARCHANT, R.; ALAMEDA, E. J.; ROMÁN, M. G.; BANAT, I. M. Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mil waste as sole carbono source. Bioresource Technology. V. 198, p. 231-236, 2015.

RAPP, P.; BOCK, H.; WRAY, V.; WAGNER, F. Formation, isolation and characterisation of trehalosedimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkenes. J Gen Microbiol v. 15, p. 491-503, 1979.

RAZA, Z. A.; KHALID, Z. M.; BANAT, I. M. Characterization of rhamnolipids produced by a *Pseudomonas aeruginosa* mutante strain grown on waste oils. J Environ Sci Health Part A – Toxic/Hazard Substances Environ Eng, v 44, p. 1367-1373, 2009.

REIS, F. A. S. L. Estudo da Síntese de Biossurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC6633. (Dissertação de Mestrado), UFRJ, 1998, 107p.

RIVAS, M. B. Soja – Qualidade de vida e saúde com prazer e sabor. Ed. AGE, 2006.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ROSENBERG, E.; ZUCKERBERG, A.; RUBINOVITZ, C.; GULNIK, D. L. Emulsifier Arthrobacter RAG-1: Isolation and emulsifying properties. Applied Environ. Microbiol., v. 37, n. 10, p. 419-424, 1979.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High and low-molecular-mass microbial surfactants. Applied Microbiol. Biotechnol., v. 52 (2), p. 154-162, 1999.

SGARBIERI, V. C. Proteínas em Alimentos Proteicos: Propriedades, Degradações, Modificações. São Paulo: Varela, 1996, 517 p.

SILVERSTAIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Identificação espectrométrica dos compostos orgânicos. 6ª ed.; LTC: Rio de Janeiro – RJ, 2000.

SIM, L.; WARD, O. P.; LI, Z. Y. Production and characterisation of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, Hampshire, v.19, p. 232-238, 1997.

SIQUEIRA, P. F. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. Master Dissertation, Federal University of Paraná/ Universities of Provence and of the Mediterranean, 2007.

SMITH, A. K.; CIRCLE, S. J. Soybean: chemistry and technology. v.1, Westport: The AVI publishing company, 1975. 470p.

SMYTH, T. J. P.; PERFUMO, A.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids. In: Timmis KN (ed) Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Springer, Berlin, p. 3705–3723, 2010 - a.

SMYTH, T. J. P.; PERFUMO, A.; McCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. Isolation and analysis of lipopeptides and high molecular weight biosurfactants. In: Timmis KN (ed) Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Springer, Berlin, p. 3689–3704, 2010 - b.

STRÖHER, R. Hidrólise enzimática da proteína do farelo de soja. Maringá-PR Brasil UEM 2010.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T.; BANAT, I. M. Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources. World J Microbiol Biotechnol, v. 24, p. 917-925, 2008.

WU, Z.; ZHONG, H.; YUAN, X.; WANG, H.; WANG, L.; CHEN, X.; ZENG, G. WU, Y. Adsorptive removal of methylene blue by rhamnolipid-functionalized graphene oxide from wastewater. Water Research, v. 67, p. 330-344, 2014.

ZAJIC, J. E.; SEFFENS, W. In: CRC Critical Reviews in Biotechnology, Biosurfactants, v. 1, n. 2, 1984.

---

---

## ANEXO

---

---

### DETERMINAÇÃO DE GORDURA PELO MÉTODO DE Blich-Dyer

#### MATERIAIS:

- Balança analítica
- Garrafas de agitação de aproximadamente 500 mL
- Agitador de garrafas
- Tubos com rosca de aproximadamente 30 mL
- Metanol P.A.
- Clorofórmio P.A.
- Sulfato de sódio anidro
- Solução de sulfato de sódio 1,5% em água
- Papel de filtro
- Funil de plástico
- Béquer de 50 mL
- Estufa

#### PROCEDIMENTO

Inicialmente, deve-se pesar entre 3,00 e 3,50 g da amostra a ser analisada. Transferir a quantidade pesada para as garrafas de ensaio e adicionar exatamente:

- 10 mL de clorofórmio;
- 20 mL de metanol;
- 6,9 mL de água destilada\*.

Após, tampar hermeticamente as garrafas e colocá-las no agitador por 30 minutos, na velocidade 4. Em seguida, adicionar 10 mL de clorofórmio e 10 mL da solução de sódio 1,5%. Agitar por mais 2 minutos. A adição de mais clorofórmio e mais água causa a separação total do clorofórmio que carrega os lipídeos (camada inferior), portanto todos os lipídeos da amostra ficam dissolvidos em 20 mL de clorofórmio. Aguardar cerca de 10 minutos para que as camadas da solução se separem.

Após a separação, retirar 15 mL da camada inferior (clorofórmio) e colocá-los no tubo de 30 mL. Adicionar 1 g de sulfato de sódio anidro, tampar e agitar para remover os possíveis traços de água. Filtrar em um funil pequeno, com papel de filtro, onde a solução deverá estar límpida. Retirar exatamente 5 mL da solução filtrada e despejá-los num béquer previamente

## *ANEXO*

---

pesado. Colocar o béquer em estufa a 100 °C até que o solvente evapore. Resfriar em um dessecador e pesá-lo novamente.

Para o cálculo da porcentagem de lipídeos presentes na amostra deve-se:

$$\% \text{lipídeos} = \frac{P_L \times 4 \times 100}{P_A}$$

sendo:

$P_L$  é a diferença do béquer com e sem a mostra;

$P_A$  é a quantidade de amostra utilizada no experimento.

– Calcular a porcentagem de lipídeos presentes na amostra analisada.

\* Os três solventes utilizados coexistem em uma solução homogênea, quando amostras contém mais de 10% de água a relação dos solventes 1:2:0,8 deve ser feita considerando a porcentagem de água da amostra.