

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
UNIVERSIDADE ABERTA DO BRASIL
CENTRO DE TECNOLOGIA
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM EFICIÊNCIA ENERGÉTICA
APLICADA AOS PROCESSOS PRODUTIVOS

Naiara Elisa Kreling

PRODUÇÃO DE BIOCOMPOSTO DE ORIGEM RENOVÁVEL
UTILIZANDO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS COMO
FERRAMENTA DE ANÁLISE VISANDO EFICIÊNCIA ENERGÉTICA

Panambi, RS
2017

Naiara Elisa Kreling

**PRODUÇÃO DE BIOCOMPOSTO DE ORIGEM RENOVÁVEL UTILIZANDO
PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS COMO FERRAMENTA DE ANÁLISE
VISANDO EFICIÊNCIA ENERGÉTICA**

Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Eficiência Energética Aplicada aos Processos Produtivos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Eficiência Energética Aplicada aos Processos Produtivos.

Orientador: Carlos Roberto Cauduro

Panambi, RS
2017

Naiara Elisa Kreling

**PRODUÇÃO DE BIOCOMPOSTO DE ORIGEM RENOVÁVEL UTILIZANDO
PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS COMO FERRAMENTA DE ANÁLISE
VISANDO EFICIÊNCIA ENERGÉTICA**

Trabalho de conclusão apresentado ao Curso de Especialização em Eficiência Energética Aplicada aos Processos Produtivos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Eficiência Energética Aplicada aos Processos Produtivos.

Aprovado em julho de 2017:

Claudio Roberto Losekan, Dr. (UFSM)
(Presidente/Co-Orientador)

Cristiano José Scheuer, Dr. (UFSM)
(1º Avaliador)

Ademar Michels, Dr. (UFSM)
(2º Avaliador)

Panambi, RS
2017

RESUMO

PRODUÇÃO DE BIOCOMPOSTO DE ORIGEM RENOVÁVEL UTILIZANDO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS COMO FERRAMENTA DE ANÁLISE

AUTORA: Naiara Elisa Kreling
Orientador: Carlos Roberto Cauduro

Os biossurfactantes caracterizam-se por emulsificar compostos oleosos durante processos de biorremediação, e podem ser produzidos por diversos microrganismos. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada em bioprocessos industriais já estabelecidos, como fermentação de pães, vinhos e cervejas, possuindo potencial para a produção deste biocomposto. Objetivou-se produzir biossurfactantes pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando diferentes substratos no meio de cultivo. A levedura foi submetida a variações na concentração e no tipo de indutor, sendo a produção avaliada a cada dois dias pela determinação da atividade emulsificante e redução da tensão superficial do meio de cultivo. O indutor que apresentou maior formação de emulsões do tipo água/óleo foi o óleo de soja na concentração de 4,25 g/L de glicose e 134 g/L de indutor (7,12 UE). Utilizando planejamento de experimentos, percebeu-se que o modelo linear proposto é adequado para o indutor óleo diesel, mas que não é adequado para o indutor óleo de soja. Ainda, as condições experimentais propostas devem ser otimizadas para que identifique-se a concentração ideal para as fontes nutricionais necessárias a produção de biossurfactantes pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Palavras-chave: óleo diesel, óleo de soja, *Saccharomyces cerevisiae*, delineamento experimental

ABSTRACT

PRODUCTION OF BIOCOMPOSTS OF RENEWABLE ORIGIN USING EXPERIMENTAL PLANNING AS AN ANALYSIS TOOL

AUTHOR: Naiara Elisa Kreling
ADVISOR: Carlos Roberto Cauduro

Biosurfactants are characterized by emulsifying oily compounds during bioremediation processes, and can be produced by various microorganisms. *Saccharomyces cerevisiae* yeast is used in established industrial bioprocesses, such as fermentation of breads, wines and beers, with potential for the production of this biocompound. The aim was to produce biosurfactants by *Saccharomyces cerevisiae* yeast using different substrates in the culture medium. The yeast was submitted to variations in the concentration and type of inducer, and the production was evaluated every two days by determination of the emulsifying activity and reduction of the surface tension of the culture medium. The inducer with the highest formation of water/oil type emulsions was soybean oil in the concentration of 4.25 g/L of glucose and 134 g/L of inducer (7.12 UE). Statistically evaluating the data, it was noticed that the proposed linear model is suitable for the inductor diesel oil, but that is not suitable for the soybean oil inducer. Moreover, the proposed experimental conditions should be optimized to identify the ideal concentration for the nutritional sources necessary for the production of biosurfactants by the *Saccharomyces cerevisiae* yeast.

Key words: diesel oil, soybean oil, *Saccharomyces cerevisiae*, experimental design

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Definição esquemática das tensões superficial e interfacial.	14
Figura 2 – Arranjo molecular anfipático em água (A) e formação de micelas (B).	16
Figura 3 – Esquema geométrico e delineamento experimental para 2 ou mais fatores, variando em 2 níveis.....	23
Figura 4 – Detalhamento do processo de leitura da atividade emulsificante água/óleo.....	28
Figura 5 – Equipamento tensiômetro, responsável pelas leituras de tensão superficial de líquidos	29
Figura 6 - Atividades emulsificantes obtidas para a levedura <i>S. cerevisiae</i> utilizando óleo diesel (a) e óleo de soja (b) como indutores	31
Figura 7 - Gráfico de Pareto dos efeitos estimados, para os indutores óleo de soja (a) e óleo diesel (b), respectivamente	36
Figura 8 – Efeitos de interação para os indutores óleo de soja (a) e óleo diesel (b) testados com a concentração de glicose adicionada ao meio de cultivo	37
Figura 9 – Gráfico de probabilidade normal dos resíduos, para os indutores óleo diesel (a) e óleo de soja (b), respectivamente	39
Figura 10 – Pontos de ótimo indicando as maiores atividades emulsificantes, para os indutores óleo diesel (a) e óleo de soja (b), respectivamente	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores reais e codificados para o planejamento fatorial completo 2^2 com adições de pontos centrais para os indutores óleo de soja e óleo diesel.....	27
Tabela 2 - Delineamento experimental para o planejamento fatorial completo 2^2 com adições de pontos centrais para os indutores, na ordem randomizada.	30
Tabela 3 – Valores (mN/m) e redução da tensão superficial (%) do meio de cultivo livre de células, para a levedura <i>S. cerevisiae</i>	33
Tabela 4 - Análise de variância dos dados em função das variáveis do Planejamento Fatorial 2^2	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLASVREVIATURAS

CMC	Concentração micelar crítica
PHA	Hidrocarbonetos poliaromáticos
HPA	Compostos aromáticos policíclicos
RTS	Redução da tensão superficial
UE	Unidades de Emulsificação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	OBJETIVOS.....	11
2.1	Objetivo Geral.....	11
2.2	Objetivos Específicos.....	11
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1	Surfactante Químico.....	12
3.2	Biocomposto: Surfactante biológico ou biossurfactante.....	12
3.3	Produção de biossurfactantes por leveduras.....	16
3.4	Aplicações ambientais de biossurfactantes.....	18
3.4.1	Remoção de metais.....	19
3.4.2	Biorremediação.....	20
3.4.3	Limpeza de reservatórios de óleos.....	20
3.4.4	Recuperação melhorada do petróleo (MEOR).....	21
3.5	Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
3.6	Utilização de planejamentos estatísticos.....	22
3.7	Planejamentos fatoriais.....	24
3.7.1	Análise de variância e teste de Tukey.....	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1	Determinações Analíticas.....	27
4.1.1	Atividade Emulsificante Água em Óleo.....	27
4.1.2	Tensão Superficial.....	28
4.2	Tratamento dos dados.....	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1	Produção de biossurfactantes extracelulares.....	31
5.2	Tratamento dos dados.....	34
6	CONCLUSÃO.....	42
7	SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS.....	43
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

A produção de surfactantes químicos apresenta risco de impacto ambiental, pois apresentam problemas quanto a sua degradação e toxicidade (SOBRINHO et al., 2008). Biosurfactantes de origem microbiana vem ganhando destaque à medida que a produção industrial se encaminha para desenvolver tecnologias mais sustentáveis e com menor dano ao meio ambiente.

Considerando a aplicação destes produtos em uma gama variada de indústrias (farmacêutica, cosmética e alimentícia), os biosurfactantes também possuem aplicação na área ambiental. Estes auxiliam a remoção de contaminantes oleosos em solos e águas, necessidade proveniente do dano causado em consequência do aumento no transporte rodoviário de combustíveis e do armazenamento inadequado de substâncias perigosas.

As leveduras destacam-se na produção de biosurfactantes, sendo as do gênero *Candida* (LUNA et al., 2014) e *Yarrowia* (MORAIS; ABUT, 2013) as mais exploradas. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é investigada por ser altamente disponível e fácil de ser obtida e cultivada em razão de seu uso em indústrias de alimentos, por apresentar baixa toxicidade, e grande aplicabilidade já conhecida (FONTES et al., 2008).

Pode ser sintetizada a partir de resíduos industriais, sendo considerada uma fonte segura e renovável para tratamento ambiental, através da produção de uma substância que degrada compostos de uma forma acelerada, de forma economicamente viável e que atua na redução da contaminação, demonstrando a importância de se estudar a biomassa da levedura como agentes que auxiliem nos processos de recuperação ambiental (COSTA, 2008).

A produção de biosurfactantes consegue englobar o conceito de desenvolvimento sustentável em sua produção, pois poderá ser obtido de resíduos industriais, como de cervejarias e da fabricação de pães, agregando valor ao resíduo e reduzindo seu custo de produção, além de contribuir para a qualidade do meio ambiente por ser um composto com maior biodegradabilidade do que os surfactantes sintetizados quimicamente. Ainda, sua utilização em processos de biorremediação, em casos de acidentes e vazamentos de combustíveis, auxilia na degradação do contaminante e minimiza os impactos negativos originados pela ação antrópica.

Ainda, é importante correlacionar o uso de produtos sustentáveis com a redução do uso da energia disponível em um sistema para sua produção. Ao utilizar combustíveis de origem renovável, gera-se uma economia significativa em termos insumos necessários para a

produção dos biossurfactantes, como energia elétrica e água. Com isto, a produção torna-se sustentável e eficiente do ponto de vista energético.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral foi produzir biossurfactantes pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando diferentes substratos no meio de cultivo.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos serão:

- a) Verificar para qual indutor testado foi observado a maior produção de biossurfactantes;
- b) Utilizar o delineamento experimental como forma de maximização dos dados obtidos nos ensaios.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Surfactante Químico

De acordo com Nitscke e Pastore (2002), surfactantes são moléculas anfipáticas por possuírem alta capacidade emulsificante, compostas por porções hidrofóbicas e porções hidrofílicas. A porção polar pode ser iônica, não-iônica ou anfotérica, já a porção apolar é usualmente constituída por uma cadeia de hidrocarbonetos. Distribuem-se na fase líquida de compostos provocando a interação água/óleo ou óleo/água do meio.

As frações hidrofílicas e hidrofóbicas na mesma molécula adquirem propriedades específicas. Devido a estas propriedades exclusivas, os surfactantes possuem grande aplicabilidade industrial, que podem envolver emulsificação, detergência, solubilização, dispersão de fases e capacidade de formar espumas (ARAUJO; FREIRE, 2013).

Surfactantes são utilizados como matéria prima em diversos setores da indústria e principalmente para o uso em detergentes domésticos, na produção de produtos de limpeza (tais como sabões e detergentes), indústria de petróleo, cosméticos e higiene, sendo em sua maioria, sintetizados a partir de derivados de petróleo. Podem estar presentes de forma natural em diversos meios, como por exemplo: em plantas (saponinas), no organismo humano (sais biliares) e em microrganismos (glicolipídeos).

Busca-se a substituição dos surfactantes sintéticos pelos naturais, onde principalmente são pesquisados compostos de origem microbiana, definidos como biocompostos. Estes possuem propriedades surfactantes idênticas aos sintéticos (diminuir a tensão superficial e possuir alta capacidade emulsificante) e recebem o nome de biossurfactantes, que se constituem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras (ARAUJO; FREIRE, 2013).

3.2 Biocomposto: Surfactante biológico ou biossurfactante

Os biossurfactantes, surfactantes de origem microbiana (bactérias, fungos ou leveduras) possuem as mesmas propriedades dos surfactantes sintéticos, com a vantagem de apresentarem maior tolerância a variações de temperatura e pH, e serem passíveis de manipulação genética. Por serem biodegradáveis em água e solos, tornam-se adequados para aplicações ambientais. São considerados uma alternativa a produção de surfactantes sintéticos, principalmente por serem menos poluentes (COLLA; COSTA, 2003). Da mesma

forma que os surfactantes, possuem na mesma estrutura uma fração lipofílica (composta por cadeias hidrocarbonica de um ou mais ácidos graxos – saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados) e outra fração hidrofílica (éster, grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato).

São classificados de acordo com sua composição química e origem microbiana, e entre as classes principais encontram-se os glicolipídios (subgrupos ramnolipídios, soforolipídios), lipopeptídios e lipoproteínas (subgrupos visconina, surfactina, polimixina, dentre outros), ácidos graxos, lipídios neutros e fosforolipídios (ácidos graxos, lipídios neutros, fosfolipídios), surfactantes poliméricos (manana-lipídio-proteína, emulsan, liposan, dentre outros), manoproteínas e soforolipídios (DESAI; BANAT, 1997).

Sua produção em escala industrial é realizada com derivados do petróleo (de 70% a 75% dos surfactantes comercializados nos Estados Unidos são de origem petroquímica), e devido a possível escassez desta fonte, as indústrias tendem a buscar por produtos biodegradáveis, investindo na substituição dos surfactantes químicos pelos naturais, os biossurfactantes (NITSCKE; PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes, surfactantes de origem microbiana (bactérias, fungos ou leveduras) são subprodutos do metabolismo microbiano, e possuem as mesmas propriedades dos surfactantes sintéticos (redução da tensão superficial e interfacial e aumento da capacidade emulsificante), com a vantagem ainda de apresentarem maior tolerância a variações de temperatura e pH, possuindo maior probabilidade de serem produzidos em ambientes com condições mais extremas, e passíveis de manipulação genética, o que facilitaria o desenvolvimento de uma grande variedade de produtos para especificações diferentes. São ainda, ao contrário dos biossurfactantes químicos, biodegradáveis em água e solos, o que os torna adequados para aplicações ambientais. A baixa toxicidade dos biossurfactantes faz com que seja possível sua aplicação em alimentos, cosméticos e fármacos, não prejudicando a saúde do ser humano (ARAUJO et al., 2013).

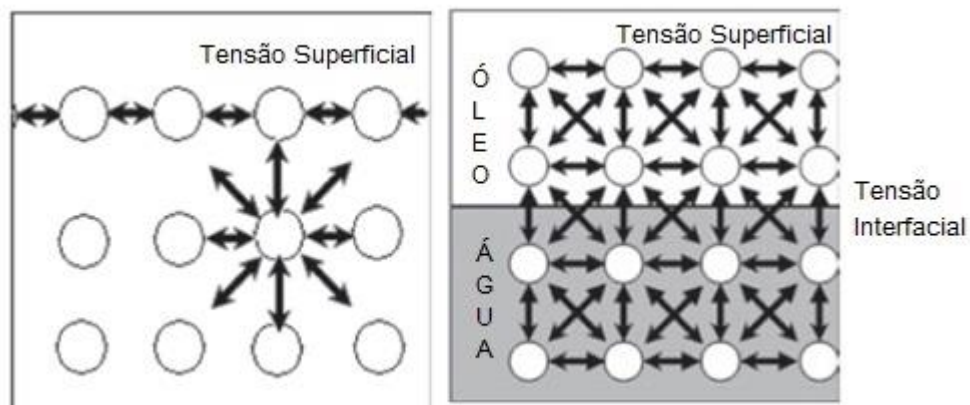
Também possuem em sua estrutura porções lipofílicas (geralmente composta por ácidos graxos) e porções hidrofílicas (geralmente ésteres, fosfatos ou carboidratos), e variam de pequenos ácidos graxos até grandes polímeros, apresentando geralmente carga neutra ou aniônica, possuindo como principal função fisiológica a emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou outros agentes incapazes de se diluírem em água (SATPUTE et al., 2010).

O aumento no interesse nas pesquisas pela produção de biossurfactantes é justificada pela baixa toxicidade destas moléculas em comparação aos surfactantes sintéticos (o que facilita sua utilização em processos de produção de alimentos, cosméticos e produtos

farmacêuticos, sem acarretar em prejuízo para a saúde do ser humano), o fato de serem biodegradáveis em solo e água e na possibilidade de que sejam gerados a partir de substratos oriundos de resíduos de processos industriais, como de alimentos e agricultura, o que também agrega valor ao resíduo e diminui os custos com a produção, através da geração de uma finalidade nobre aos rejeitos dos processos. São ainda passíveis de manipulação genética, permitindo o desenvolvimento de uma variedade de produtos conforme necessidades específicas.

Os surfactantes oriundos de microrganismos possuem diversas finalidades, como emulsificação, separação de fases e redução da viscosidade em óleos. Dentre estas propriedades, as que mais se destacam são a tensão superficial (mensurado através do parâmetro A/O) e a tensão interfacial (mensurada através do parâmetro A/O). Na tensão superficial, conforme mostra a Figura 1, as moléculas de água são mantidas unidas através de forças de coesão. Estas forças atrativas entre as moléculas constituem a tensão na superfície. A atividade interfacial entre a água e o óleo também é apontada esquematicamente na Figura 1 (SATPUTE et al., 2010).

Figura 1 – Definição esquemática das tensões superficial e interfacial.



Fonte: SATPUTE et al., 2010, adaptado.

A propriedade de emulsificação baseia-se na dispersão de um líquido em outro, levando a mistura de dois líquidos imiscíveis. A de-emulsificação é o processo de quebra de emulsões pela ruptura entre ambas as fases, e pode ser obtida através de perturbações termodinâmicas nas interfaces de interesse. Atuam também como dispersantes, reduzindo a atração existente entre moléculas, mantendo as partículas insolúveis em suspensão, evitando sua agregação com as demais partículas do meio. A propriedade de detergência está associada

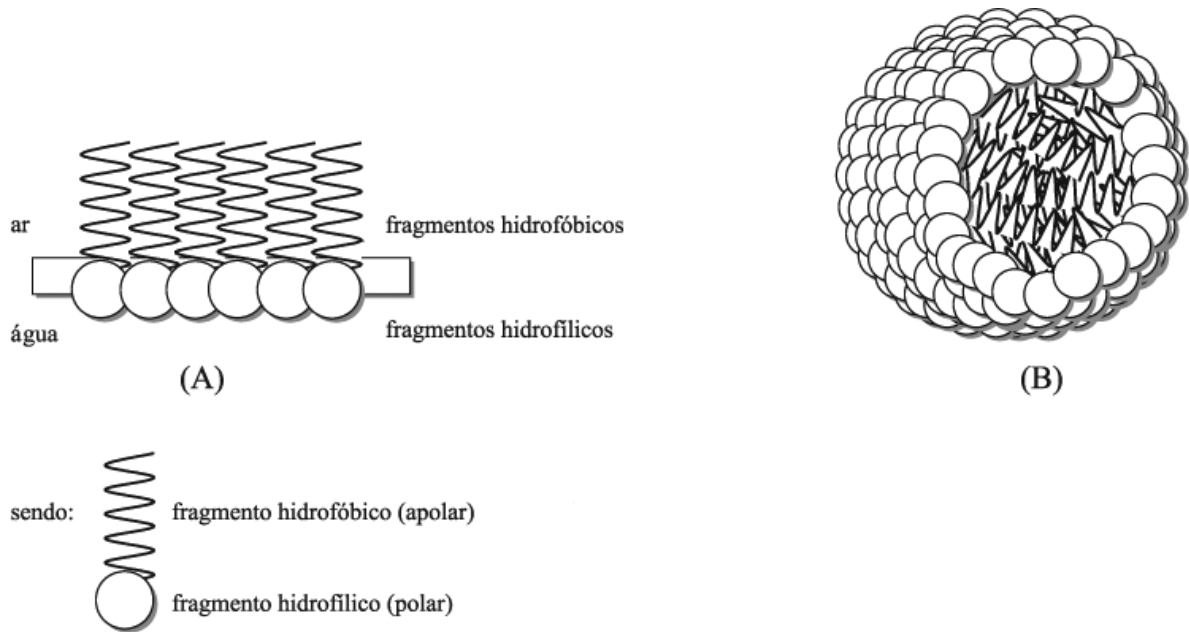
a atividades de limpeza e lavagem. Ainda, sua alta tolerância a condições extremas de temperatura, pH e força iônica aumentam suas vantagens de uso em relação aos surfactantes convencionais, pois aumentam a possibilidade de produção de biossurfactantes em ambientes e condições mais extremas (SATPUTE et al., 2010).

As propriedades dos biossurfactantes são, principalmente, a redução da tensão superficial e a formação de emulsões. A emulsificação baseia-se na dispersão de um líquido em outro, levando a mistura de dois líquidos imiscíveis. A redução da tensão superficial ocorre quando a concentração de células de biossurfactantes no meio aumenta, formando micelas (moléculas biossurfactantes agregadas). A concentração destas moléculas no meio estabelece a Concentração Micelar Crítica (CMC), definida como a mínima concentração de surfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo (LUNA, 2010; PREVIDELLO et al., 2006).

Os biossurfactantes podem ser divididos em: biossurfactantes de baixo ou alto peso molecular. Os de baixo peso molecular são formados por carboidratos e ácidos graxos alifáticos, como os glicolipídeos, raminolipídeos e surfactina, e estão associados a redução da tensão superficial do meio. Os de alto peso molecular são formados por lipoproteínas, polissacarídeos e proteínas, e caracterizam-se como importantes formadores de emulsões (ROSENBERG; RON, 1999).

A tensão superficial (força de atração que existe entre as moléculas dos líquidos) diminui quando a concentração de células de biossurfactantes no meio aumenta, ocorrendo a formação de micelas (moléculas anfipáticas de biossurfactantes agregadas, onde a porção hidrofílica é posicionada para a parte externa da molécula e a porção hidrofóbica para a parte interna da molécula). A concentração destas moléculas no meio estabelece a Concentração Micelar Crítica (CMC), definida como a mínima concentração de surfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo. Uma ilustração da formação de micelas é apresentada na Figura 2 (LUNA, 2010).

Figura 2 – Arranjo molecular anfipático em água (A) e formação de micelas (B).



Fonte: PREVIDELLO et al. (2006).

3.3 Produção de biossurfactantes por leveduras

A produção de biossurfactantes por leveduras ocorre quando adicionados ao meio de cultivo fontes de carbono solúveis em água (como açúcares na forma de glicose e sacarose), com a combinação de substratos hidrofóbicos (hidrocarbonetos, óleos e gorduras). Esta combinação entre um substrato solúvel em água e outro hidrofóbico faz com que maiores produções sejam atingidas, pois os agentes formadores de emulsão são gerados apenas quando substratos imiscíveis em água são adicionados ao meio e metabolizados pela célula (BHARDWAJ et al., 2013).

Uma das grandes dificuldades encontradas na produção de biossurfactantes em escala industrial são as fontes de substrato a serem utilizadas, devido principalmente ao alto custo que representam. Com isto, alternativas de substratos pesquisados são, principalmente, resíduos e subprodutos de produções industriais, provenientes da fabricação de pães, cervejas e da indústria agrícola. Isto é vantajoso para o meio ambiente, pois reduz o volume de resíduos gerados e aterrados, reutilizando-os como fonte de nutriente para os microrganismos (FARIA, 2010).

A composição e as características dos biossurfactantes produzidos podem ser influenciados por: fontes de carbono e nitrogênio, presença de micronutrientes, pH, temperatura e agitação do meio. Estes fatores afetam a quantidade de biossurfactante a ser produzido e na determinação dos requerimentos nutricionais necessários as células. A produção é induzida através da inserção de compostos lipofílicos no meio de cultivo, exposição da célula a condições de estresse (como baixa concentração de nutrientes), variações no pH, na temperatura e na velocidade de agitação (FONTES et al., 2008).

Os substratos solúveis em água (glicose e sacarose, por exemplo), são utilizados por primeiro pelas células microbianas para o metabolismo celular e para a formação da fração polar da molécula do biossurfactante. O substrato hidrofóbico é então utilizado em um segundo momento, exclusivamente para a produção da fração apolar (hidrocarbônica) da molécula anfipática do biossurfactante. As diversas vias metabólicas utilizadas nos processos de produção dos biossurfactantes irão depender principalmente da fonte de carbono (ou da fonte de substrato) utilizada no meio de cultivo.

Quando utilizado um hidrocarboneto como fonte de carbono, o metabolismo encaminha-se para a glicogênese e para a via lipolítica, desta mesma forma produzindo ácidos graxos ou sacarídeos. Com a formação do ácido graxo, este é convertido a acetilcoenzima A através de β -oxidação ou propionilcoenzima A, se os ácidos graxos forem de cadeia ímpar. A partir da formação da acetilcoenzima A, as reações envolvidas são inversas as daquelas envolvidas na glicólise para a formação de glicose-6-fosfato, que dará origem aos polissacarídeos e dissacarídeos que serão formados para a porção hidrofílica. Assim, pode-se afirmar que a formação do biossurfactante pode ser alterado pelo comprimento da cadeia de *n*-alcano utilizadas como fonte de carbono (FONTES et al., 2008).

Quanto à fonte de nitrogênio, necessária para a produção de proteínas e enzimas, diversas fontes têm sido estudadas, tais como: extrato de levedura, peptona, ureia, sulfato de amônio, nitratos, extratos de carne e de malte. Dentre estes, o extrato de levedura é o mais utilizado como fonte de nitrogênio, variando a sua concentração de acordo com o microrganismo e o meio de produção (FARIA, 2010).

Fai et al. (2015) estudaram a otimização de produção de biossurfactantes por *Pseudozyma tsukubaensis* utilizando água residuária da produção de mandioca. As melhores condições verificadas foram de 80% de água residuária a uma temperatura de 30°C, com agitação de 200 rpm por 48 horas. A menor tensão superficial obtida foi de 26,78 mN/m e produção de biomassa de 10,5 g/L.

Ilori et al. (2008) isolaram *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* obtidas de uma lagoa poluída e avaliaram seu potencial de produção de biossurfactantes em meio de cultivo contendo 1% de óleo diesel durante 7 dias. A atividade emulsificante das leveduras foi de 61,4% e 64,2%, respectivamente, sendo que a atividade emulsificante aumentava proporcionalmente com o crescimento celular.

Luna et al. (2014) investigaram a produção de biossurfactantes por *Candida Sphaerica* em meio de cultivo contendo 9% de óleo de amendoim e 9% de resíduo da produção de milho, utilizando frascos para cultivo e um biorreator. A tensão superficial da água foi reduzida de 72 mN/m para 25 mN/m quando utilizado os frascos de cultivo e para 27 mN/m quando utilizado o biorreator, e apresentando um rendimento de 21 g/L em 144 horas de cultivo.

3.4 Aplicações ambientais de biossurfactantes

Surfactantes químicos encontram sua aplicação em diversos campos, tais como: agricultura, construção, indústrias de bebidas alimentícias, limpeza industrial, biorremediação de poluentes insolúveis em água, lubrificantes, indústrias petroquímicas e de petróleo, dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleos em tanques de estocagem, dentre outros. Em muitos casos, a substituição de surfactantes por biossurfactantes é viável e já se encontra em fase de estudos.

Segundo Fontes et al. (2008), as propriedades que os biossurfactantes possuem (emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, redução de viscosidade de líquidos e da tensão superficial) podem ser empregadas em diversos setores industriais, estando o principal foco na indústria petrolífera. A grande vantagem da empregabilidade dos biossurfactantes está no potencial de recuperação de derivados do petróleo, que podem ser utilizados para limpeza de tanques, misturas óleo-álcool para combustíveis e dispersão em derramamentos de óleos em água. No Quadro 1 são citados exemplos de biossurfactantes e sua respectiva aplicação ambiental.

Quadro 1 - Classificação, exemplos de microrganismos e possíveis aplicações ambientais

Tipo de Biossurfactante	Origem microbiana	Aplicação ambiental
Glicolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Torulopsis bombicola</i>	Aumento da degradação e dispersão de diferentes hidrocarbonetos; Remoção de metais do solo e de sedimentos;
Lipopeptídeos e lipoproteínas	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Recuperação de petróleo; Degradação de hidrocarbonetos e pesticidas clorados;
Ácidos graxos, fosfolipídios e lipídios neutros	<i>Penicillium spiculisporum</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Aumento da tolerância bacteriana aos metais pesados; Remoção de íons metálicos de soluções aquosas; Ação de dispersão para pigmentos hidrofílicos.
Surfactantes poliméricos e particulados	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Estabilização de emulsões de hidrocarbonetos em água; Dispersão de calcário em água.

Fonte: Fontes et al., 2008

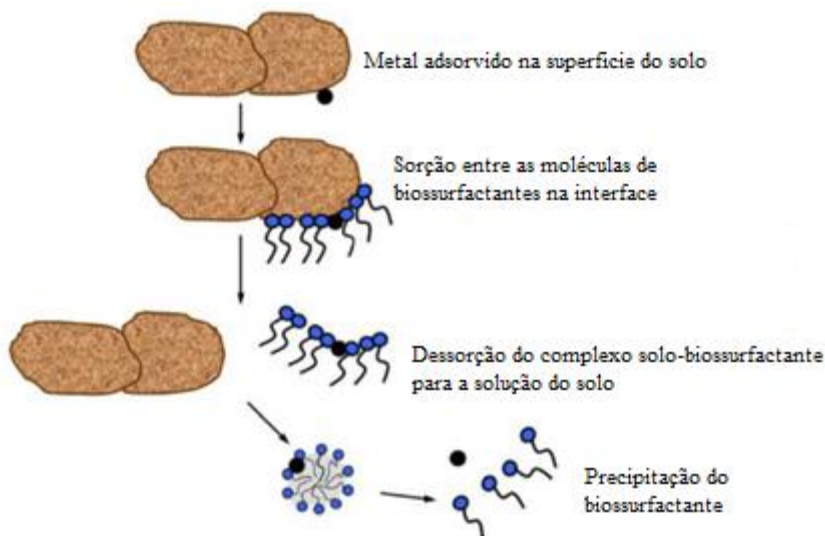
3.4.1 Remoção de metais

Para a remoção de metais, os microrganismos que representam a classe das surfactinas, ramnolipídios e soforolipídios mostraram-se efetivos na remoção de cobre e zinco de solos contaminados com hidrocarbonetos, mostrando eficiências de remoção de até 70%, quando a eficiência de remoção mostrada por surfactantes químicos foi de 30%.

Outro exemplo de aplicação investigado é a biodegradação de hidrocarbonetos poliaromáticos (PHA) com quatro ou mais anéis aromáticos. Os biossurfactantes auxiliam no processo de biodegradação dos compostos hidrofóbicos, baixa solubilidade em água e grande capacidade de adsorção em solos.

A Figura 3 esquematiza o processo de remoção dos metais através da adição de biossurfactantes em solos.

Figura 3 - Atividade biossurfactante em solos contaminados com metais



Fonte: Pacwa-Płociniczak et al (2011).

3.4.2 Biorremediação

Através do metabolismo de microrganismos, a biorremediação é uma tecnologia utilizada para a eliminação dos poluentes ou a sua redução a concentrações aceitáveis.

Com a capacidade de aumentar a interação entre a superfície água e óleo, emulsificar e dispersar hidrocarbonetos, podem acelerar a degradação de óleos e promover a biorremediação de solos e águas, tornando a biodegradação a maneira mais eficiente de remover poluentes, principalmente em casos de acidentes com derramamento de óleo, onde estes causam sérios problemas ecológicos e sociais. Porém, estes estudos ainda são realizados em escalas laboratoriais (NITSCHKE E PASTORE, 2002).

Outros exemplos nos quais biossurfactantes são estudados para testar sua eficiência e empregabilidades são: emulsificar e aumentar a solubilidade de compostos hidrofóbicos no solo, aumento da biodisponibilidade de compostos aromáticos policíclicos (HPA), degradação de pesticidas e na degradação de metais tóxicos.

3.4.3 Limpeza de reservatórios de óleos

Os resíduos de tanques de estocagem de óleos sedimentam no fundo, são de grande viscosidade e depositam sólidos não removíveis através de bombeamento convencional. Para remover o resíduos, geralmente são utilizados solventes ou limpeza manual, o que torna-se caro, demorado e perigoso.

O uso alternativo de biossurfactantes neste processo promove a formação de emulsões O/A e a diminuição da viscosidade, facilitando a recuperação do óleo cru após o bombeamento e quebra da emulsão. Cerca de 90% dos hidrocarbonetos presentes no resíduo foram recuperados utilizando-se os biossurfactantes ao invés de surfactantes convencionais (NITSCHKE E PASTORE, 2002).

3.4.4 Recuperação melhorada do petróleo (MEOR)

Segundo Araujo e Freire (2013), trata-se de uma tecnologia que utiliza microorganismos ou produtos de seu metabolismo para a recuperação de óleo residual, através da redução da tensão superficial óleo-rocha, diminuindo as forças capilares que impedem a movimentação do óleo através dos poros da rocha, proporcionada pelos polímeros e surfactantes produzidos pelos microrganismos.

Alguns efeitos envolvidos no tratamento do resíduo envolvem: redução da viscosidade do óleo e da tensão interfacial, produção de biossurfactantes, produção de solventes, degradação das macromoléculas do óleo - o que diminui a viscosidade. Pode ser realizado adicionando-se microrganismos produtores de biossurfactantes ou a injeção de nutrientes, o que estimula o crescimento microbiano.

3.5 Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras são fungos unicelulares, que reproduzem-se através de brotação ou cissiparidade. Possuem forma oval, esférica ou elíptica. Dependem principalmente de fontes de carbono para seu desenvolvimento, sendo os carboidratos a maior fonte relevante. Glicose, frutose e manose são exemplos de açúcares simples que também podem ser assimilados como forma de nutriente (GUIMARÃES, 2005).

A parede celular das leveduras representam de 15% a 25% da massa seca da célula, sendo de origem polissacarídica e proteica. A organização da parede celular proporciona a célula uma grande capacidade protetora e, devido a sua formação macromolecular, a forma da própria célula. A parede celular da levedura é constituída principalmente de β -glucanos e manoproteínas. Para a *S. Cerevisiae* em específico, os β -glucanos representam até 60% da massa seca da parede celular. Manoproteínas representam cerca de 25 à 50% da parede desta levedura.

A *Saccharomyces cerevisiae*, especificamente, é a que maior apresenta valor comercial e industrial, por tratar-se de agentes de transformação utilizados em indústrias de bebidas fermentadas (cervejarias), de panificação e destilarias de etanol, possuem alta capacidade de desenvolvimento em diferentes substratos e estarem facilmente disponíveis, facilidade de obtenção e multiplicação, possibilidade de cultivo independente do ambiente, pequena exigência de água e área e formação de produtos de grande valor nutritivo. Sua grande vantagem está em seu status GRAS (generally regarded as safe), o que significa que não representam riscos toxicológicos e de patogenicidade, podendo ser aplicados em indústrias farmacêuticas e de alimentos (COSTA et al., 2010).

A grande quantidade de biomassa residual gerada demonstra a necessidade de estudos para que estes resíduos tenham reaproveitamento, originando novos compostos ou produtos. Como exemplo da aplicação do resíduo desta levedura, Costa et al. (2010), utilizaram a biomassa residual de indústria de cervejaria, para a extração de manoproteínas. As condições ótimas de extração foram em um tempo de 9 h a temperatura de 95°C, para suspensão de 10% da parede celular. O extrato obtido apresentou alto teor de proteínas, carboidratos e uma alta concentração de nutrientes, e boas propriedades emulsificantes, tornando-se uma opção a ser utilizado por indústrias farmacêuticas. Os bioemulsificante obtidos de *Saccharomyces cerevisiae* apresentam a porção proteica como a responsável pelas propriedades emulsificantes, e os carboidratos de cadeias curtas aumentam a solubilidade do composto e atribuem estabilidade a emulsão.

Barriga et al. (1999) buscaram a produção de um bioemulsificante a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, objetivando a utilização em indústrias alimentícias e de cosméticos, utilizando a levedura residual de cervejarias e vinícolas. O bioemulsificante é uma manoproteína solúvel em água, e facilmente extraída da parede celular, sendo sua principal composição proteínas e carboidratos.

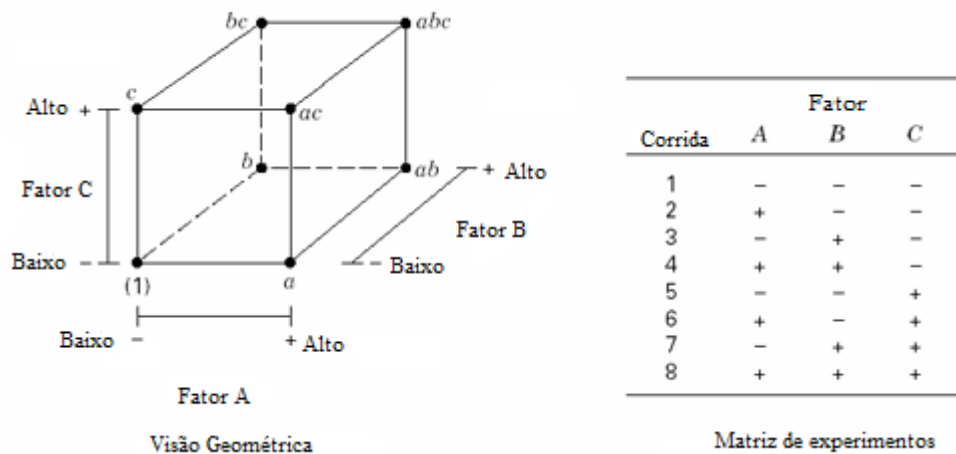
3.6 Utilização de planejamentos estatísticos

Para que um processo seja desenvolvido ou aprimorado, o uso de um planejamento experimental faz-se necessário para avaliar os efeitos da interação entre as variáveis sobre a resposta. Para esta determinação, o planejamento experimental pode ser executado de forma a avaliar um fator por vez, mantendo-se fixas as demais variáveis de resposta, ou através da variação conjunta de fatores (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Ao avaliar uma variável por vez, metodologia também conhecida como método “one-at-a-time”, estuda-se uma variável em diferentes condições, sendo as demais variáveis do estudo mantidas fixas. Após a execução e interpretação do ensaio, encontra-se o melhor valor dentre as condições propostas. Este valor é então fixado, sendo as outras variáveis relevantes para o estudo alteradas, até que todas tenham sido testadas. Apesar do grande uso deste método, não há detecção das possíveis interações existentes entre duas ou mais variáveis, conforme pode ser verificado na Figura 3. Três variáveis denominadas A, B, e C, variando em dois níveis indicados por + e - entre os valores extremos de cada variável. Por exemplo: o efeito da variável “A” é verificado através da média da diferença dos pontos a+ e a-, respectivamente.

No processo do experimento os dados usados são codificados como +1 e -1, seguido das possíveis interações entre todas as variáveis A, B e C, analisando o comportamento da resposta frente a estas interações. Neste processo pode-se verificar uma interação entre duas ou três variáveis.

Figura 3 – Esquema geométrico e delineamento experimental para 2 ou mais fatores, variando em 2 níveis



Fonte: RODRIGUES; IEMMA, 2005.

A variação conjunta de fatores origina seu resultado através da elaboração de uma matriz, onde todas as combinações podem ser avaliadas a fim de que se obtenha a resposta final do problema. Este método é considerado vantajoso em relação ao anteriormente explicado por possuir a capacidade de analisar todo o espaço experimental.

3.7 Planejamentos fatoriais

Uma opção do planejamento estatístico é o planejamento experimental fatorial, onde pode-se empregar menor número de medidas e tem-se a oportunidade de explorar todo o espaço experimental desejado. Os sinais de “+” ou “-” representam os níveis altos de baixos de um fator. Para planejamentos experimentais do tipo 2^2 , geometricamente, as quatro possíveis combinações formam os vértices de um quadrado. No planejamento experimental fatorial, existe a possibilidade de uma maior região de estudo, com menor número de ensaios a serem realizados. Neste procedimento, também pode-se calcular o erro experimental, necessário para estimar a reprodutibilidade do processo. Com ele, também se permite elaborar um modelo matemático, que pode ser utilizado para originar a superfície de resposta, e que a partir desta consiga-se otimizar o experimento proposto (MONTGOMERY D; RUNGER, 2013).

Neste tipo de planejamento, existe a possibilidade de que todas as variáveis sejam modificadas simultaneamente, podendo-se levar em consideração a influência mútua do valor ideal para que se atinja a melhor resposta desejada. Assim, é possível que se estude um efeito conjunto de fatores sobre determinada variável de resposta de interesse, determinando-se k fatores, presentes no experimento em diferentes níveis. O caso mais utilizado de planejamento experimental é aquele em que cada fator está presente em dois níveis. Na realização de um ensaio deste tipo, os experimentos serão executados $2 \times k$ vezes, gerando 2^k observações da variável resposta. Este planejamento é denominado portanto um experimento fatorial 2^k (NEVES, et al., 2002).

De acordo com Rodrigues e Iemma (2005), para que se estime o número necessário de planejamentos experimentais que serão necessários para a otimização de um determinado processo, é preciso que se determine o número de variáveis independentes a serem estudadas. Para 2 ou 3 variáveis independentes (ou fatores), é indicado o uso de delineamentos fatoriais completos, sendo a seguir, objetivando a otimização, executados delineamentos compostos centrais rotacionais (denominados como metodologia de superfície de resposta).

Existe interação entre os fatores estudados quando observa-se que as respostas entre os níveis dos fatores não são as mesmas para todos os níveis do outro fator, isto significa que o efeito de um fator depende do nível considerado do outro fator, e vice versa. O efeito de um fator é definido como a variação na resposta produzida por uma mudança no nível do fator. Se os fatores A e B são quantitativos, então um modelo linear geral pode ser utilizado para representar o experimento fatorial, como o da Equação 1:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{12}x_1x_2 + \varepsilon \quad (1)$$

Onde y é a resposta, β são os parâmetros do modelo, x_1 e x_2 representam os efeitos principais dos fatores A e B, respectivamente, x_1x_2 representa a interação entre os fatores A e B, e ε é um termo de erro.

3.7.1 Análise de variância e teste de Tukey

Para que se faça a análise do experimento proposto, requer-se a utilização de testes de significância. A análise de variância (ANOVA) determina se um fator é significativo ou não sobre determinada resposta. Esta análise pode ser utilizada para o teste de um único fator de estudo (one-way), ou mais de um fator de estudo, ou seja, quando os fatores são múltiplos (main effects). É um teste de hipótese onde objetiva-se analisar a variação das médias dos resultados do teste, e demonstrar quais fatores que realmente produzem efeitos significativos nas respostas (NETO et al., 2010).

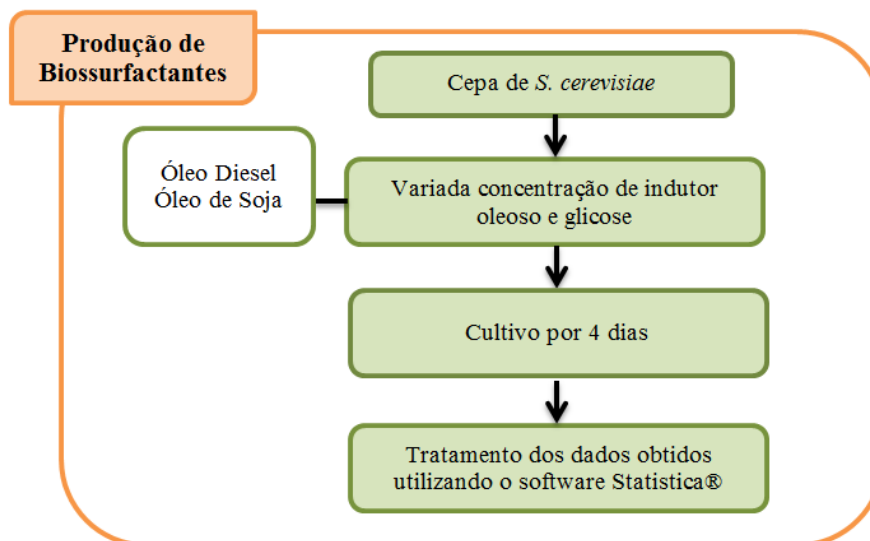
Para que se possa mensurar a probabilidade do erro do teste, define-se um valor, também chamado de valor p . Por definição, quando o valor de p for maior do que o nível de significância, existe a evidência de que o tratamento é significativo. O valor P também é conhecido como a probabilidade de ocorrência do erro tipo I, ou seja, de que se rejeite uma hipótese quando esta for verdadeira (MONTGOMERY; RUNGER, 2013).

Entretanto, não indica quais dos tratamentos é o ideal. Para isto, pode-se utilizar o teste de Tukey, complementar a análise de variância, e que realiza um teste de comparação entre médias.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O delineamento experimental foi realizado conforme o fluxograma da Figura 4.

Figura 4 – Fluxograma dos experimentos realizados



Fonte: O autor

A verificação da produção de biossurfactantes pela levedura *S. cerevisiae* foi realizada através da execução de um ensaio com variadas concentrações de indutores, objetivando o consumo de fontes oleosas de carbono.

Utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada obtida na forma comercial foi utilizada para a produção de biossurfactantes extracelulares. A partir de estudos previamente realizados (KRELING et al., 2015), foram realizados ensaios com concentrações de indutores de até 234 g/L, sendo observados efeitos positivos do aumento da concentração de indutores oleosos. Desta forma, a levedura liofilizada foi cultivada em meios de cultivo com concentrações de indutores superiores aos ensaios realizados anteriormente. Os indutores oleosos foram adicionados por serem fontes insolúveis de carbono, responsáveis pela formação da fração apolar da molécula de biossurfactante. A glicose foi inserida como fonte solúvel e necessária para formar a fração polar da molécula. Diferentes fontes de carbono insolúvel foram testadas a fim de verificar sua capacidade de produção de biossurfactantes extracelulares. As concentrações de glicose e indutores utilizados para os planejamentos experimentais da primeira etapa apresentam-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores reais e codificados para o planejamento fatorial completo 2² com adições de pontos centrais para os indutores óleo de soja e óleo diesel

Experimento	X₁ - Glicose	X₂ – Indutores
1	1,5 g/L (-1)	34 g/L (-1)
2	7,0 g/L (+1)	34 g/L (-1)
3	1,5 g/L (-1)	234 g/L (+1)
4	7,0 g/L (+1)	234 g/L (+1)
5	4,25 g/L (0)	134 g/L (0)
6	4,25 g/L (0)	134 g/L (0)
7	4,25 g/L (0)	134 g/L (0)

Fonte: O autor

O meio de cultivo utilizado para a produção de biossurfactantes continha 0,5% de extrato de levedura, 1% de peptona, 0,2% de sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O), 0,1% fosfato monopotássico (KH₂PO₄), glicose e indutores conforme as variações do planejamento experimental (Tabela 1), com pH ajustado entre 6,0 e 6,5. Adicionou-se 50 mL do meio preparado em erlenmeyers de 250 mL, e esterilizou-se em autoclave por 21 minutos à 121°C. A inoculação dos meios foi realizada com 1% (p/v) de levedura comercial liofilizada. Os cultivos foram mantidos por 4 dias sob agitação constante de 200 rpm, sendo que amostras foram coletadas nos tempos inicial, 2 e 4 dias para determinação da atividade emulsificante A/O e da tensão superficial, consideradas as variáveis de resposta do estudo.

4.1 Determinações Analíticas

4.1.1 Atividade Emulsificante Água em Óleo

A análise foi realizada de acordo com o método adaptado do índice de emulsificação, proposto por Cooper e Goldenberg (1987). O meio de cultivo foi centrifugado e 3,5 mL do sobrenadante coletado e adicionado em tubo de ensaio juntamente com 2 mL de biodiesel.

A mistura foi agitada em agitador Vórtex a 700 rpm por 1 min. Após 24 h de repouso foi realizada a leitura da altura da emulsão água/óleo formada e da altura total da emulsão (altura da emulsão mais altura da camada remanescente de óleo), com paquímetro eletrônico digital, gerando a atividade emulsificante água/óleo, de acordo com as Equações 1 e 2. Brancos foram realizados utilizando extrato no lugar da amostra.

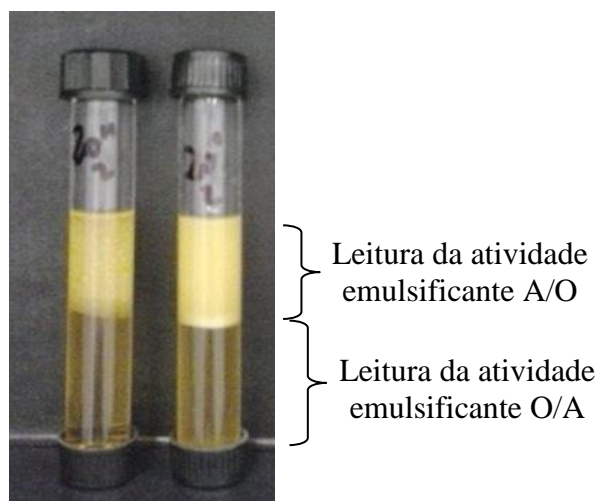
$$E = \left(\frac{h_{emulsão}}{h_{total}} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

$$AE_{A/O} = (E_{amostra} - E_{branco}) \quad (2)$$

Onde: $AE_{A/O}$ = atividade emulsificante água em óleo (UE); $H_{emulsão}$ = altura da camada de emulsão; H_{total} = altura da camada total; E = relação centesimal entre a altura da emulsão água/óleo e a altura total.

O detalhamento da análise é ilustrado na Figura 4 a seguir, sendo a emulsão água em óleo verificada na camada superior do tubo.

Figura 4 – Detalhamento do processo de leitura da atividade emulsificante água/óleo



Fonte: O autor

4.1.2 Tensão Superficial

A tensão superficial foi determinada no meio livre de células, de acordo com o método do anel (Du-Nuoy's ring method), com tensiômetro marca Biolin Scientific, modelo Sigma 702. O percentual de redução da tensão superficial em relação à tensão superficial do início do processo fermentativo foi calculado através da Equação 3.

$$RTS (\%) = \frac{TS_{inicial} - TS_{final}}{TS_{inicial}} * 100 \quad (3)$$

Onde: RTS= Redução da tensão superficial (%), TS_{inicial} = Tensão superficial dos meios no início do processo fermentativo (mN/m), TS_{final} = Tensão superficial dos meios no fim do processo fermentativo (mN/m).

O detalhamento da análise é ilustrado na Figura 5 a seguir, sendo o valor da tensão superficial do meio de cultivo verificado através de leitura automatizada realizada pelo equipamento.

Figura 5 – Equipamento tensiômetro, responsável pelas leituras de tensão superficial de líquidos



Fonte: O autor

4.2 Tratamento dos dados

Para o planejamento experimental proposto, a análise estatística dos dados será realizada com o auxílio do software Statística 7.0®, através de análise de variância para um nível de confiança de 95%. A fim de reduzir o erro analítico e garantir a aleatorização, a ordem de execução dos planejamentos experimentais foi obtido também com o auxílio do software, conforme a Tabela 2. A variável de resposta é a atividade emulsificante A/O, expressa em Unidades de Emulsificação (UE).

Tabela 2 - Delineamento experimental para o planejamento fatorial completo 2^2 com adições de pontos centrais para os indutores, na ordem randomizada.

Experimentos	Ordem de execução aleatorizada	X₁ - Glicose	X₂ - Indutor
1	1º	1,5 g/L (-1)	34 g/L (-1)
2	6º	4,5 g/L (0)	134 g/L (0)
3	5º	4,5 g/L (0)	134 g/L (0)
4	3º	1,5 g/L (-1)	234 g/L (+1)
5	4º	7,0 g/L (+1)	234 g/L (+1)
6	7º	4,5 g/L (0)	134 g/L (0)
7	2º	7,0 g/L (+1)	34 g/L (-1)

Fonte: O autor

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de biossurfactantes extracelulares

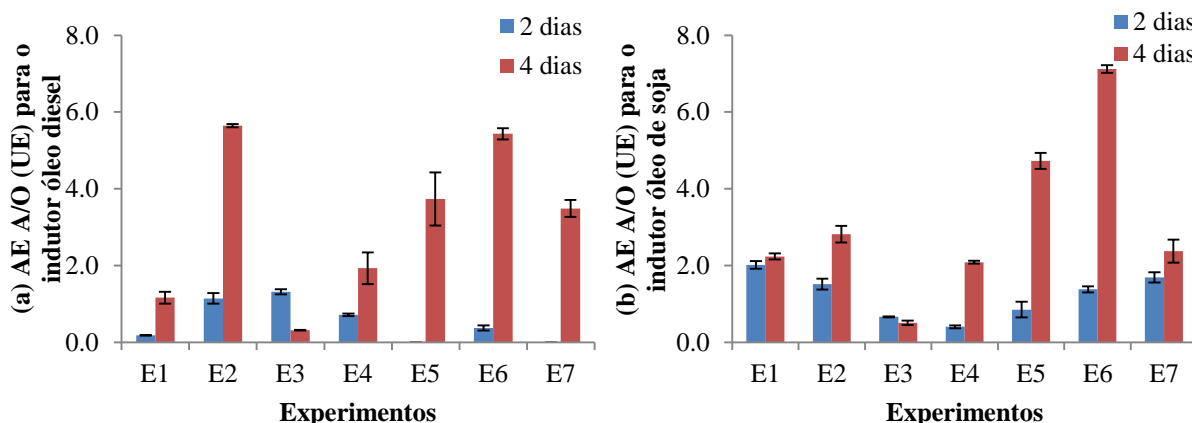
A Figura 6 apresenta as atividades emulsificantes A/O obtidas para cada experimento, no segundo e no quarto dia de cultivo.

Para o indutor óleo diesel, foram verificadas maiores atividades emulsificantes ao final do quarto dia de produção. Os experimentos E2 (7,0 g/L de glicose e 34 g/L de indutor) e E6 (4,25 g/L de glicose e 134 g/L de indutor) demonstraram as maiores atividades emulsificantes A/O para o ensaio, de 5,64 UE e 5,43 UE, respectivamente.

No indutor óleo de soja, verifica-se também o aumento da formação de atividade emulsificante no quarto dia de produção. As maiores atividades emulsificantes também foram verificadas para o E6 e E5 (4,25 g/L de glicose e 134 g/L de indutor), com formações de emulsões de 7,12 UE e 4,72 UE, respectivamente.

Para ambos os indutores, percebeu-se que, independente da concentração de indutores ou glicose adicionada nos meios de cultivo, os experimentos obtiveram aumento nas atividades emulsificantes do segundo para o quarto dia de cultivo.

Figura 6 - Atividades emulsificantes obtidas para a levedura *S. cerevisiae* utilizando óleo diesel (a) e óleo de soja (b) como indutores



E1: 1,5 g/L glicose e 34 g/L indutor; E2: 7,0 g/L glicose e 34 g/L indutor; E3: 1,5 g/L glicose e 234 g/L indutor; E4: 7,0 g/L glicose e 234 g/L indutor; E5, E6, e E7: 4,25 g/L glicose e 134 g/L indutor.

Fonte: O autor

A produção de biossurfactantes é dependente da adição ao meio de cultivo de fontes de carbono solúveis em água, tais como glicose e sacarose, combinados com fontes de

carbono insolúveis, tais como hidrocarbonetos, óleos e gorduras. A união destas fontes de nutrientes faz com que se atinja uma maior produção de atividade emulsificante, pois a formação de emulsão ocorre apenas quando substratos insolúveis em água são metabolizados pela célula (BHARDWAJ et al., 2013).

A maior formação de atividades emulsificantes A/O demonstrada pelo indutor óleo de soja é justificado pela característica hidrofóbica que esta fonte de carbono possui, que aliado à glicose como substrato hidrofílico torna-se a combinação necessária para a formação da molécula característica de um biossurfactante (SATPUTE et al., 2010). Como menores valores de atividade emulsificante foram verificados para o indutor óleo diesel, é possível que, por se tratar de um óleo que possui uma estrutura química complexa, essa fonte de carbono seja de difícil assimilação para o microrganismo, comprometendo o crescimento celular e a produção de biossurfactantes neste tipo de substrato (ACCORSINI et al., 2012).

Por ser um composto de origem vegetal, o óleo de soja é provavelmente assimilado de forma mais fácil pelo microrganismo em relação ao outro indutor testado. Isto justifica a menor formação de emulsões do tipo A/O para o indutor óleo diesel, pois houve baixo consumo deste tipo desta fonte de carbono como substrato pela levedura. Makkar e Rockne (2003) afirmam que as fontes de carbono simples são preferíveis pelos microrganismos em relação as fontes complexas, como o óleo diesel. Por isto a produção de biossurfactantes é maior quando utilizado o indutor óleo de soja como substrato.

Alcantara et al. (2012), testaram a produção de biossurfactantes extracelulares para uma cepa isolada de *Saccharomyces cerevisiae* 2031 utilizando como substrato 80 g/L de glicose e 50 g/L de óleo de cozinha, sendo que a maior atividade emulsificante obtida foi de 15,61 UE, em 4 d de produção.

Lima e Alegre (2009) verificaram a produção de biossurfactantes para a levedura *Saccharomyces lipolytica* utilizando 50 g/L de óleo diesel como substrato, obtendo formação de emulsões de 0,23 UE. Testando também uma adição de 20 g/L de indutor, maiores resultados de atividade emulsificante foram obtidos (2,69 UE). O presente estudo corrobora com os dados obtidos pelo autor, pois o óleo diesel também apresentou menor formação de emulsões, sendo portanto descartado como fonte de carbono viável para a produção de biossurfactantes por *S. cerevisiae*.

A Tabela 3 indica os experimentos onde houve efetiva redução da tensão superficial no tempo final de cultivo (quatro dias) em relação ao tempo inicial de cultivo. Os demais experimentos não expostos na referida tabela não obtiveram redução de tensão superficial final em relação a tensão inicial verificada no começo do bioprocessamento.

Tabela 3 – Valores (mN/m) e redução da tensão superficial (%) do meio de cultivo livre de células, para a levedura *S. cerevisiae*

Tempos (d)		0	2		4	
Indutores	Experimento	TS (mN/m)	TS (mN/m)	R ₂₋₀ (%)	TS (mN/m)	R ₄₋₀ (%)
Óleo Diesel	E2	28,67 ± 0,22	41,13 ± 0,02	0,00	28,34 ± 0,06	1,15
	E7	29,92 ± 0,25	41,68 ± 0,03	0,00	29,77 ± 0,01	0,5
Óleo de Soja	E1	33,01 ± 0,04	37,02 ± 0,17	0,00	32,67 ± 0,04	1,03
	E4	31,88 ± 0,00	32,44 ± 0,12	0,00	31,44 ± 0,04	1,38
	E5	32,30 ± 0,05	32,73 ± 0,45	0,00	31,73 ± 0,38	1,76

Fonte: O autor

Verifica-se que o óleo de soja também se destacou como indutor onde foi observada a maior redução da tensão superficial. Todas as reduções foram observadas no quarto dia de bioprocessamento. Para os experimentos E4 (E4: 7,0 g/L glicose e 234 g/L indutor) e E5 (4,25 g/L glicose e 134 g/L indutor) verificou-se uma redução de 31,88 mN/m para 31,44 mN/m e de 32,30 mN/m para 31,73 mN/m, respectivamente. Para o indutor óleo diesel, a redução de 1,15% ocorreu apenas para o experimento E2 (7,0 g/L glicose e 34 g/L indutor) no quarto dia de cultivo, de 28,67 mN/m para 28,34 mN/m.

Entretanto, como pode ser observado, o bioprocessamento apresentou baixos valores de redução da tensão superficial, todos próximos de 1%. O baixo valor verificado para os ensaios deve-se ao fato de que o biossurfactante produzido pela levedura *S. cerevisiae* é caracterizado por possuir alto peso molecular, e este tipo de biossurfactante tem sua capacidade de formação de micelas (agregados de biossurfactantes) comprometida. Uzoigwe et al. (2015) afirmam que a isto deve-se ao arranjo molecular do meio, influenciando nas ligações hidrofóbicas e hidrofílicas, e limitando a capacidade do biossurfactante de reduzir a tensão superficial.

Como os diferentes tipos de indutores testados não demonstraram redução da tensão superficial do meio de cultivo, as pequenas variações verificadas não podem ser consideradas como indicadores da produção de biossurfactantes extracelulares pela levedura *S. cerevisiae*. Uzoigwe et al. (2015) também afirmam que um biossurfactante que possui a propriedade de redução de tensão superficial de meios são caracterizados como sendo de baixo peso molecular, o que facilita a formação das micelas responsáveis pela desestabilização das forças de coesão de fluídos e consequente redução da tensão.

Os biossurfactantes poliméricos, como os produzidos pela *S. cerevisiae*, apresentam alto peso molecular, o que interfere na capacidade deste tipo de biossurfactante de formar micelas. Devido a isto, a variável de resposta tensão superficial terá pouca relevância no estudo do comportamento deste biossurfactante, sendo por isto descartada da análise estatística apresentada na etapa a seguir.

Accorsini et al. (2012), estudaram a produção de biossurfactantes a partir da levedura *Candida antarctica*, utilizando glicerol como substrato, verificando uma redução de tensão superficial de 47 mN/m para 32 mN/m. Os valores obtidos neste estudo indicam que a redução da tensão superficial é influenciada pelo peso molecular dos biossurfactantes poliméricos, fazendo com que as reduções observadas (próximas a 1%) não sejam expressivas.

5.2 Tratamento dos dados

Para melhor compreensão acerca da influência das variáveis, realizou-se a análise de variância dos resultados por meio do módulo Experimental Design do Software Statistica 7.0. A Tabela 4 apresenta a análise de variância (ANOVA) dos dados de massa de grãos residual em função dos fatores variáveis.

Tabela 4 - Análise de variância dos dados em função das variáveis do Planejamento Fatorial 2^2

Fator	Somatório dos quadrados (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média quadrada (MQ)	F	P
Indutor Óleo de Soja					
Curvatura	26,7018	1	26,7018	10,5821	0,0099
Glicose [x ₁]	2,0058	1	2,0058	0,7949	0,3958
Óleo de soja [x ₂]	2,6398	1	2,6398	1,0461	0,3330
[x ₁] · [x ₂]	0,3559	1	0,3559	0,1410	0,7159
Erro	22,7095	9	2,232		
Total SS	54,4129	13	R ² = 0,5826		
Indutor Óleo Diesel					
Curvatura	9,9569	1	9,9569	17,1112	0,0025
Glicose [x₁]	12,9991	1	12,9991	22,3393	0,0010
Óleo diesel [x₂]	6,3409	1	6,3409	10,8970	0,0092
[x₁] · [x₂]	7,4550	1	7,4550	12,8117	0,0059
Erro	5,2370	9	0,5818		
Total SS	41,9890	13	R ² = 0,8752		

Fonte: O autor

Considerando que para a análise foi fixado um intervalo de confiança de 95% e nível de significância (α) igual a 0,05, observa-se na Tabela 4 que, para o indutor óleo de soja, a curvatura teve um efeito significativo, e para o indutor óleo diesel, a curvatura, a glicose, o óleo diesel e a interação entre ambos foram significativos para a formação de emulsões do tipo A/O. Isto pode ser afirmado já que o valor “p”, que representa o nível de significância real de cada análise (ou seja, a margem de erro real ao concluir que o tratamento é significativo) foi menor do que 0,05.

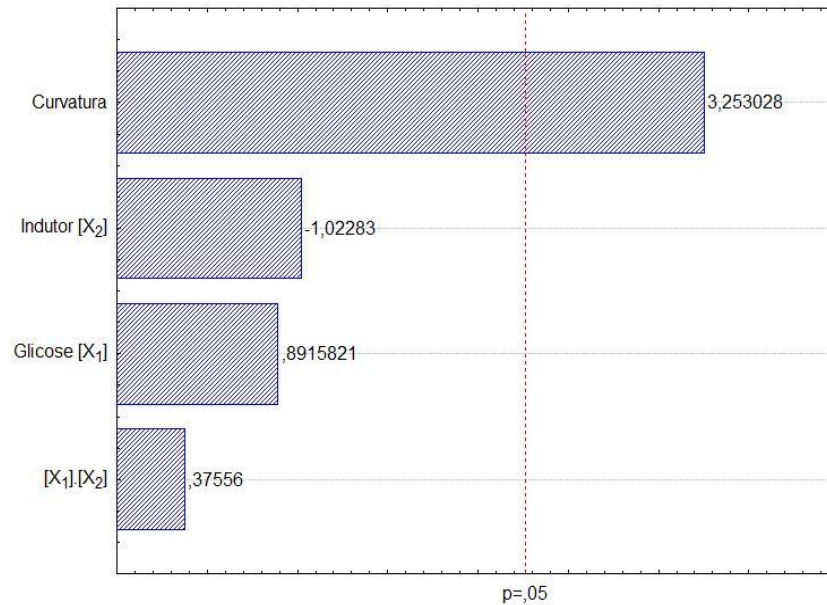
Como a curvatura apresentou-se significativa, em função do valor “p” menor do que o nível de significância estabelecido ($p_{\text{óleo de soja}} = 0,0099$; $p_{\text{óleo de soja}} = 0,0025$), conclui-se que há ponto de mínimo ou de máximo entre os valores dos experimentos, levando à necessidade de se realizar um deslocamento do planejamento.

A Figura 7 apresenta o Gráfico de Pareto dos efeitos principais e cruzados estimados a um nível de significância de 95%.

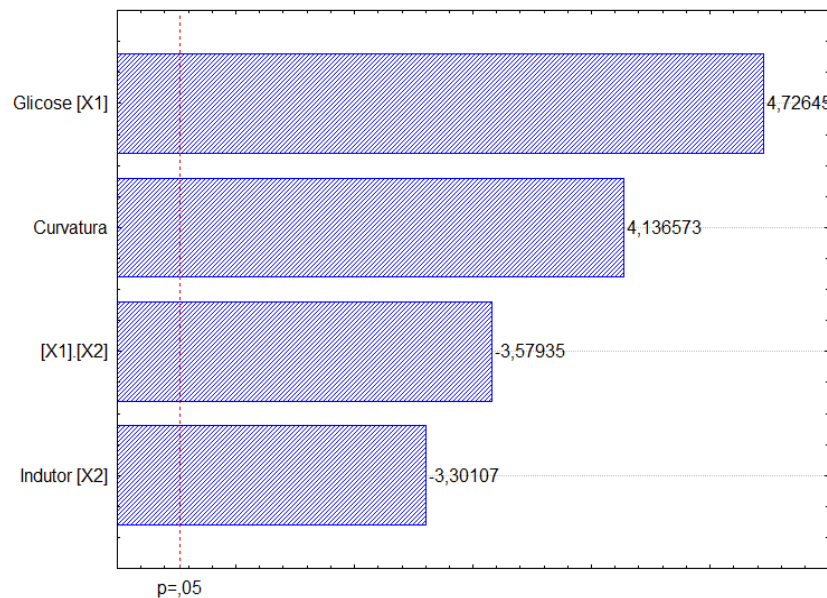
Corroborando as informações obtidas por meio da Análise de Variância, verifica-se que os fatores curvatura para o indutor óleo de soja, e os fatores glicose, indutor, interação entre ambos e curvatura, são apontados como significativos.

Figura 7 - Gráfico de Pareto dos efeitos estimados, para os indutores óleo de soja (a) e óleo diesel (b), respectivamente

(a) indutor óleo de soja



(b) indutor óleo diesel



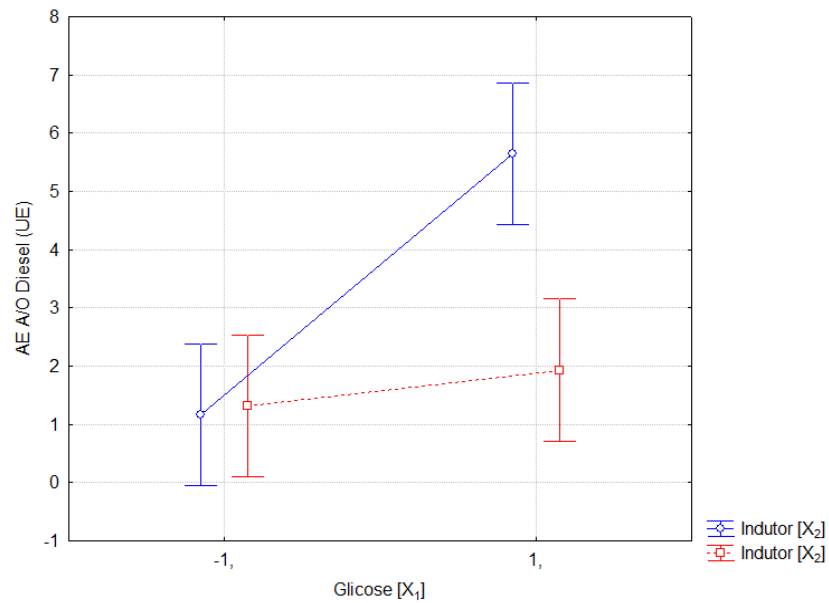
Fonte: O autor

Além disso, apresentam efeito negativo em função do aumento da produção de atividades emulsificantes A/O para o indutor óleo diesel o fator indutor, estabelecendo que quanto menos indutor é utilizado, maior é a formação de atividades emulsificantes. O efeito da glicose foi positiva para este indutor, demonstrando que quanto mais glicose é adicionada no meio de cultivo, maior é a formação de atividades emulsificantes, sendo que este fator

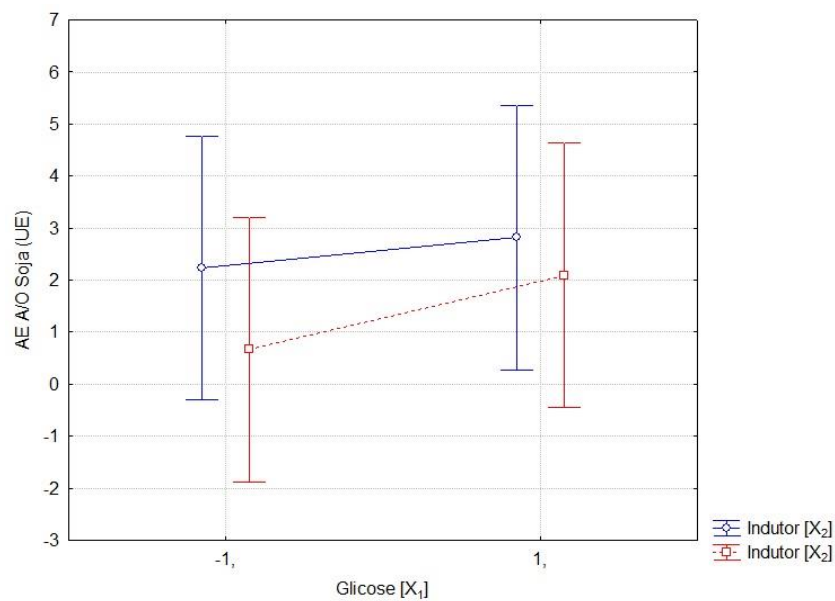
portanto influência positivamente no bioprocesso. Para o indutor óleo de soja, os efeitos não mostraram-se significativos para nenhum fator, não influenciando no processo de formação de emulsões. Estas informações podem ser verificadas na Figura 8 abaixo.

Figura 8 – Efeitos de interação para os indutores óleo de soja (a) e óleo diesel (b) testados com a concentração de glicose adicionada ao meio de cultivo

(a) indutor óleo de soja



(b) indutor óleo diesel



Fonte: O autor

Assim, dado o efeito positivo da glicose para o indutor óleo diesel, pode-se afirmar que a quantidade de óleo diesel adicionada no meio de cultivo contribuiu para a redução da variável de resposta, e que isto não ocorreu para o indutor óleo de soja. Os resultados obtidos foram ajustados a um modelo linear, conforme Equação 4.

$$y = B_0 + B_1 \cdot X_1 + B_2 \cdot X_2 + B_3 \cdot X_3 + B_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + B_{13} \cdot X_1 \cdot X_3 + B_{23} \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (4)$$

Refinando-se o modelo com a retirada dos termos não significativos, chega-se ao modelo de regressão linear apresentado na Equação 5 para atividades emulsificantes produzidas como indutor óleo diesel e na Equação 6 para o indutor óleo de soja.

$$y = 2,52 + 1,27 \cdot X_1 - 0,89 \cdot X_2 - 0,96 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (5)$$

$$y = 1,95 + 0,50 \cdot X_1 - 0,57 \cdot X_2 + 0,21 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (6)$$

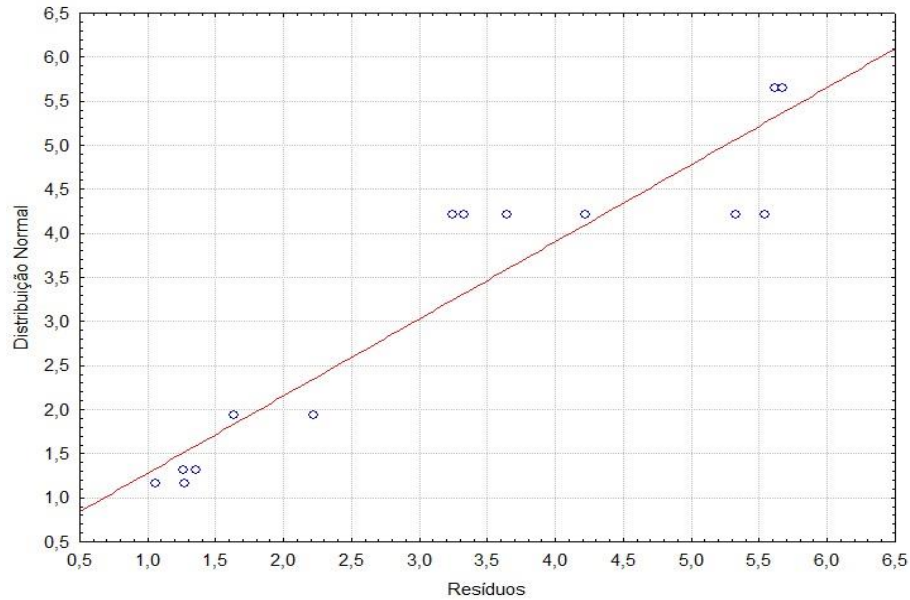
O coeficiente de determinação ajustado (R^2 adj), que representa o quão bem o modelo explica a variação estudada, apresentou um valor de 0,8198 para o indutor óleo diesel, podendo este valor ser considerado um bom ajuste dos dados obtidos em relação ao modelo proposto. Entretanto, o valor de 0,3971 obtido para o indutor óleo de soja indica que os dados possivelmente ajustam-se melhor a outros modelos que não os de regressão linear.

Analisaram-se também os resíduos, a fim de verificar a adequação dos dados aos modelos obtidos. O ajuste mostrou-se bom e possível de ser verificado por meio do coeficiente R^2 para o indutor óleo diesel ($R^2 = 0,8752$), entretanto o coeficiente não se mostrou adequado para o indutor óleo de soja ($R^2 = 0,5826$).

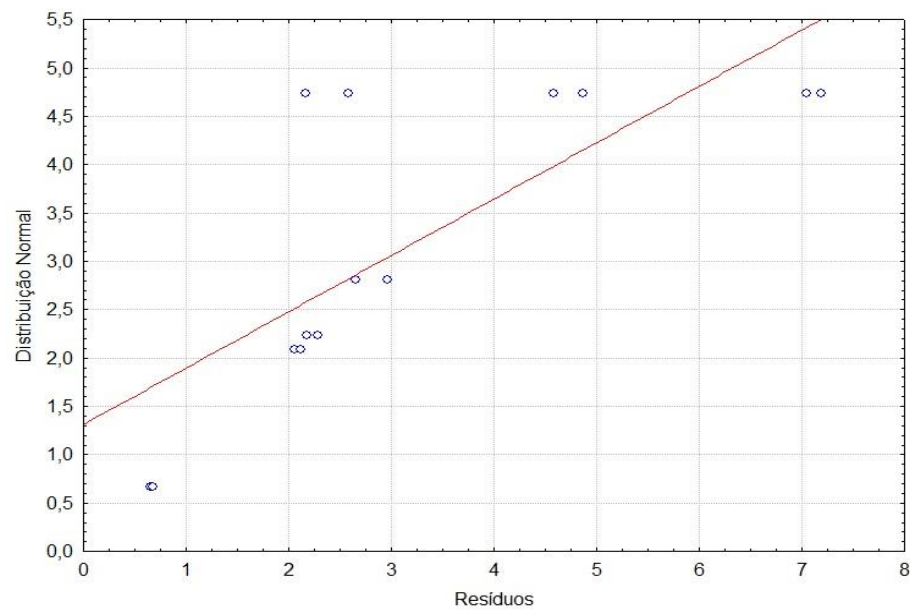
Na Figura 9, por meio dos Gráficos de Probabilidade Normal dos resíduos, pode-se considerar que os resíduos apresentam distribuição normal com média aproximadamente igual à zero. Estas constituem as primeiras premissas acerca do modelo que devem ser validadas. Como a distribuição não sugere nenhum valor de resíduo distante da linha da normalidade, observa-se que a aleatorização previamente realizada no planejamento experimental foi concluída com sucesso.

Figura 9 – Gráfico de probabilidade normal dos resíduos, para os indutores óleo diesel (a) e óleo de soja (b), respectivamente

(a) indutor óleo diesel



(b) indutor óleo diesel



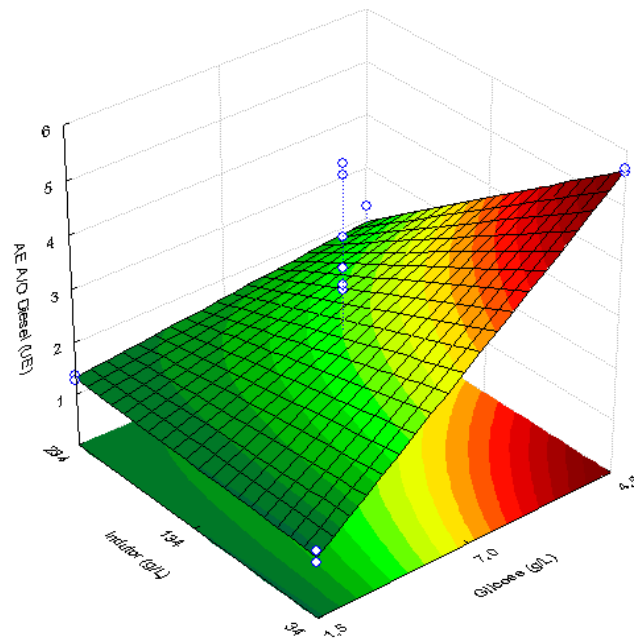
Fonte: O autor

Conforme demonstrado anteriormente pela análise de variância (ANOVA) será necessário um deslocamento do planejamento, visto que ambos os indutores indicaram a presença de pontos de máximo nos gráficos de formação de atividades emulsificantes, conforme indicado na Figura 10. Os pontos de máximo foram considerados pontos de ótimo,

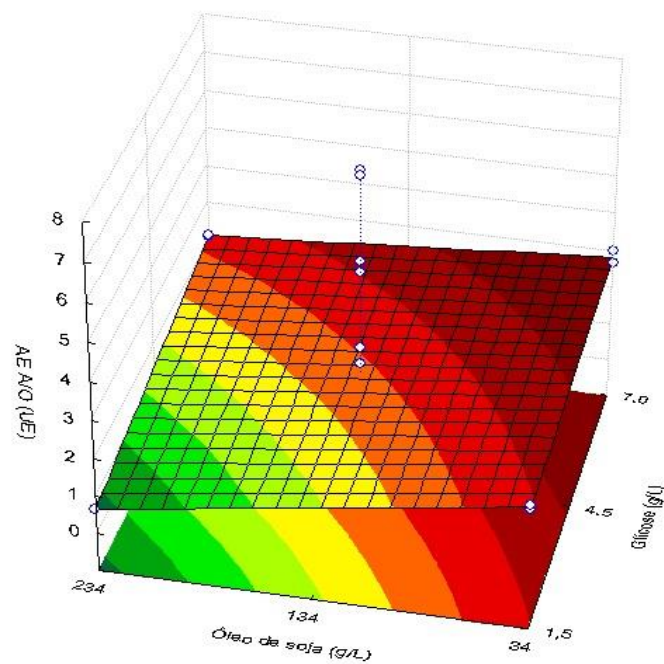
pois o objetivo é a maior formação de atividades emulsificantes. Este deslocamento pode ser feito em direção às melhores condições da análise.

Figura 10 – Pontos de ótimo indicando as maiores atividades emulsificantes, para os indutores óleo diesel (a) e óleo de soja (b), respectivamente

(a) indutor óleo diesel



(b) indutor óleo de soja



Fonte: O autor

De acordo com esta sugestão, um novo experimento pode ser realizado. Este novo experimento deve ser realizado com menores concentrações do indutor óleo diesel e maiores concentrações de glicose, conforme demonstrado pelos efeitos de interação entre estas variáveis. Para o indutor óleo de soja, apesar de o efeito das variáveis indutor e glicose não apresentarem significância, é observado maior formação de emulsões do tipo A/O, conforme apontado na Figura 10, quando menores concentrações de indutores e maiores concentrações de glicose são adicionadas ao meio de cultivo. Este deslocamento poderá contribuir para uma melhor validação das premissas do modelo.

6 CONCLUSÃO

- A maior produção de biossurfactantes foi verificada para o indutor óleo de soja, no quarto dia de cultivo;
- A redução da tensão superficial não apresentou-se considerável para o tipo de biossurfactante produzido;
- Através da análise dos efeitos, conclui-se que os efeitos significativos para o indutor óleo diesel foram a curvatura, a concentração de glicose e indutor, e a interação entre ambos;
- Para o indutor óleo de soja, apenas a curvatura apresentou efeito significativo;
- As condições experimentais devem ser otimizadas a fim de que se localize a concentração ideal para as fontes nutricionais necessárias a produção de biossurfactantes pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*;
- A produção de biossurfactantes é viável do ponto de vista da eficiência energética, pois o uso de produtos de origem renovável implica em redução de insumos para a produção, como energia elétrica e água;
- O delineamento experimental é uma técnica que pode ser aplicada em processos, possibilitando seu monitoramento e maximização dos recursos, possibilitando a melhoria da eficiência energética.

7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudo da variação do ponto ótimo em função da variação de concentração de diferentes indutores e glicose, procurando obter um mapa mais amplo dos possíveis pontos ótimos de operação;
- Testar a produção de biossurfactantes utilizando outras fontes de indutores oleosos, como glicerol, óleo de milho, óleo de soja usado;
- Testar a produção de biossurfactantes utilizando outras fontes de carbono solúvel, como glicose e frutose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCORSINI, F. R.; MUTTON, M. J. R.; LEMOS, E. G. M.; BENINCASA, M. Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 116-125, 2012.
- ACCORSINI, F. R.; MUTTON, M. J. R.; LEMOS, E. G. M.; BENINCASA, M. Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 116-125, 2012.
- ALCANTARA, V. A.; PAJARES, I. G.; SIMBAHAN, J. F.; RUBIO, M. L. D. Substrate dependent production and isolation of an extracellular biosurfactant from *Saccharomyces cerevisiae* 2031. **Philipp. J. Sci**, v. 141, p. 13-24, 2012.
- ARAUJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biosurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Quimica Nova**, v. 36, n. 6, p. 848-858, 2013.
- BARRIGA, J.; COOPER D. G.; IDZIAK E. S.; CAMERON D. R.; Components of the bioemulsifier from *S. Cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 96-102, 1999.
- BHARDWAJ, G.; CAMEOTRA, S. S.; CHOPRA, H. K. Biosurfactants from Fungi: A Review. **Journal Petroleum e Environmental Biotechnology**, v. 4, p. 160-166, 2013.
- BHARDWAJ, G.; CAMEOTRA, S. S.; CHOPRA, H. K. Biosurfactants from Fungi: A Review. **Journal Petroleum e Environmental Biotechnology**, v. 4, p. 160-166, 2013.
- COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biosurfactantes. **Vetor**, v. 13, p. 85-103, 2003.
- COOPER, David G.; GOLDENBERG, Beena G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and environmental microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.
- COSTA, A. G. **Determinação das melhores condições de extração de manoproteínas da parede celular de leveduras e sua aplicação**. 2008. Dissertação apresentada ao programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina, 2008.
- COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E.; CONTIERO, J. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 9, p. 1511-1516, 2010.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular biology reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.
- FAI, A. E. C.; SIMIQUELI, A. P. R.; ANDRADE, C. J.; GHISELLI, G.; PASTORE, G. M. Optimized production of biosurfactant from *Pseudozyma tsukubaensis* using cassava wastewater and consecutive production of galactooligosaccharides: An integrated process. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 535-542, 2015.

FARIA, A. F. **Produção, purificação e caracterização química de biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* em glicerina residual**. 2010. 173 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.

GUIMARRÃES, T. M. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

ILORI, M. O.; ADEBUSOYE, S. A.; OJO, A. C. Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing yeast strains obtained from a polluted lagoon water. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 2539-2545, 2008.

KRELING, N. E.; ZAPAROLI, M.; RODIGUERI, G.; COLLA, L. M.; Produção de biossurfactantes intra e extracelulares a partir de *Saccharomyces cerevisiae*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2015, Fortaleza.

LIMA, A. S.; ALEGRE, R. M. Evaluation of emulsifier stability of biosurfactant produced by *Saccharomyces lipolytica* CCT-0913. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 2, p. 285-290, 2009.

LUNA, J. M. **Otimização, caracterização e aplicações biotecnológicas do biossurfactante de baixo custo lunasan produzido por *Candida Sphaerica* UCP 0995**. 2010. 168 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2010.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; JARA, A. M. A. T.; BRASILEIRO, P. P. F.; SARUBBO, L. A. Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 480, p. 413-418, 2014.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; JARA, A. M. A. T.; BRASILEIRO, P. P. F.; SARUBBO, L. A. Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 480, p. 413-418, 2014.

MAKKAR, R. S.; ROCKNE, K. J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 22, n. 10, p. 2280-2292, 2003.

MONTGOMERY D. C.; RUNGER, G. C. **Estatística e Probabilidade para Engenheiros**. Quinta Edição. Editora LTC. Tradução e revisão técnica Verônica Calado. Rio de Janeiro: LTC, 2013.

MORAIS, R. K. S.; ABUD, A. K. S. Utilização de biossurfactantes produzidos a partir de resíduos agroindustriais na biorremediação do petróleo. **Scientia Plena**, v. 8, n. 10, 2013.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Bookman Editora, 2010.

NEVES, C. F. C., SCHVARTZMAN, M. M. A. M.; J., E., Variables search technique applied to gas separation. *Quim. Nova*, v. 25, n. 2, p. 327- 329, 2002.

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

PACWA-PLÓCINICZAK, M.; PLAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 12, n. 1, p. 633-654, 2011.

PREVIDELLO, B. A. F.; CARVALHO, F. R.; TESSARO, A. L.; SOUZA, V. R.; HIOKA, N. O pKa de indicadores ácido-base e os efeitos de sistemas coloidais. *Química Nova*, v. 29, n. 3, p. 600-606, 2006.

PREVIDELLO, B. A. F.; CARVALHO, F. R.; TESSARO, A. L.; SOUZA, V. R.; HIOKA, N. O pKa de indicadores ácido-base e os efeitos de sistemas coloidais. *Química Nova*, v. 29, n. 3, p. 600-606, 2006.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1ª ed. Campinas-SP: Casa do Pão Editora, 2005. ISBN 85-98389-03-X.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High-and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 52, n. 2, p. 154-162, 1999.

SATPUTE, S. K.; BANPURKAR, A. G.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANAT, I. M.; CHOPADE, B. A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical reviews in biotechnology*, v. 30, n. 2, p. 127-144, 2010.

SATPUTE, S. K.; BANPURKAR, A. G.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANAT, I. M.; CHOPADE, B. A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical reviews in biotechnology*, v. 30, n. 2, p. 127-144, 2010.

SOBRINHO, H. B. S.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SALGUEIRO, A. A.; CAMPOSTAKAKI, G. M.; LEITE, L. F. C.; SARUBBO, L. A. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. *Process Biochemistry*, v. 43, n. 9, p. 912-917, 2008.

UZOIGWE, C.; BURGESS, J. G.; ENNIS, C. J.; RAHMAN, P. K. S. M. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Frontiers in microbiology*, v. 6, p. 1-6, 2015.