

**UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO**

**ELTON RAFAEL ALVES DE OLIVEIRA**

**ESTUDO SOBRE A PRODUÇÃO DE SURFACTINA  
EM ESCALA DE LABORATÓRIO E AVALIAÇÃO DAS  
VARIÁVEIS DO PROCESSO PARA AMPLIAÇÃO DA  
ESCALA**

BAURU  
2013

**ELTON RAFAEL ALVES DE OLIVEIRA**

**ESTUDO SOBRE A PRODUÇÃO DE SURFACTINA  
EM ESCALA DE LABORATÓRIO E AVALIAÇÃO DAS  
VARIÁVEIS DO PROCESSO PARA AMPLIAÇÃO DA  
ESCALA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Exatas e Sociais Aplicadas como parte dos requisitos para a obtenção do título de bacharel em Engenharia Química, sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Me. Ana Lúcia Teixeira de Magalhães.

BAURU  
2013

Oliveira, Elton Rafael Alves de

O482e

Estudo sobre a produção de surfactina em escala de laboratório e avaliação das variáveis do processo para ampliação da escala / Elton Rafael Alves de Oliveira -- 2013. 89f. : il.

Orientadora: Profa. Me. Ana Lúcia T. de Magalhães.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Sustentabilidade. 2. Biotecnologia. 3. Biosurfactantes. 4. surfactina. 5. Sacale up. I. Magalhães, Ana Lúcia Teixeira de. II. Título.

**ELTON RAFAEL ALVES DE OLIVEIRA**

**ESTUDO SOBRE A PRODUÇÃO DE SURFACTINA EM ESCALA DE  
LABORATÓRIO E AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO  
PARA AMPLIAÇÃO DA ESCALA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Exatas e Sociais Aplicadas da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Engenharia Química, sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Me. Ana Lúcia Teixeira de Magalhães.

Banca examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Me. Ana Lúcia Teixeira de Magalhães  
Universidade do Sagrado Coração

---

Prof. Me. André Luis Antunes de Almeida  
Universidade do Sagrado Coração

---

Prof. Dr. Sandro Megale Pizzo  
Universidade Federal de São Carlos

Bauru, 10 de dezembro de 2013.

Dedico este trabalho à minha mãe, aos meus irmãos e aos amigos que participaram da minha formação como engenheiro.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por me proporcionar fé e perseverança em todo esse trajeto. Igualmente à minha mãe, Maria Célia, que esteve presente em todo o caminho com toda sua sabedoria, humildade e compaixão, a quem retribuo com essa graduação, por todo o seu esforço concedido.

Agradeço ainda, aos meus irmãos, José Roberto e Leandra, que por esses anos estiveram sempre transmitindo motivação e companhia. Que esses laços se preservem eternamente.

Agradeço à minha orientadora, Ana Lúcia, por todo o tempo e materiais disponibilizados como apoio para a elaboração deste trabalho.

Agradeço também, ao corpo docente da biblioteca pelo apoio e à todos os amigos que fizeram parte desta caminhada que se chegou ao fim, dando início a uma grande jornada.

"A biotecnologia consiste numa estonteante floresta de mistérios que emerge por entre as profundezas das águas, em direção à inovação."

(Teresa Carvalho)

## RESUMO

A sustentabilidade se mostra como uma das atuais ferramentas contra os inúmeros problemas ambientais, originados através dos mecanismos de interações humanas com a natureza para a produção de bens de consumo. Dentro desse idealismo surge a biotecnologia, um segmento tecnológico sustentável, apresentando um novo formato na produção de surfactantes. São os denominados Biossurfactantes, compostos químicos de origem microbiológica de grande importância para a sociedade atual, envolvendo setores como: indústrias de cosméticos; limpeza; petróleo; alimentos; têxtil, entre outras. Sendo a surfactina um dos mais pesquisados e que apresenta excelente potencial industrial, apesar de não existir nenhum processo consolidado em escala industrial. Suas vantagens em relação aos surfactantes oriundos de derivados do petróleo vão além da eficiente atividade superficial e interfacial, atingindo altas faixas de tolerância a temperatura, pH e força iônica, biodegradabilidade e baixa toxicidade, o que o transforma numa ótima opção sustentável. Demonstrando, assim, potencial aplicação como emulsificante, solubilizante, inibidor de corrosão, espessante, etc. Porém, o alto custo de produção ainda é a principal barreira na competição comercial com os surfactantes convencionais, sendo necessários estudos em escala de laboratório e piloto, aplicando-se melhor dimensionamento e otimização do processo, aplicação de matérias-primas e processos de purificação do produto final, economicamente viáveis. Este trabalho teve como intuito reunir informações sobre as pesquisas já efetuadas na produção de surfactina em escala de laboratório, analisando o desde o condicionamento do microrganismo até a cinética da fermentação e os processos aplicados na purificação do biossurfactante. Sendo que, a cada fase do processo, foram efetuados comparativos com conteúdos teóricos referentes a processos fermentativos mais aplicados atualmente. Abordando-se, ainda, fundamentos teóricos de Scale up para uma possível prospecção de produção em potenciais industriais.

**Palavras-chave:** Sustentabilidade. Biotecnologia. Biossurfactantes. Surfactina. Scale-up.

## ABSTRACT

The Sustainability shown as a current tools against numerous environmental problems originated by the mechanisms of human interactions with nature for the production of consumer goods. Within this idealism biotechnology, sustainable technology sector arises, presenting a new format in the production of surfactants. Biosurfactants are denominated, chemical compounds of microbiological origin of major importance to modern society, involving sectors such as cosmetics industries, cleaning, oil, foodstuffs, textile industry and others. Surfactin being one of the most researched and has excellent industrial potential, although no consolidated process on an industrial scale does not exist. Their advantages compared to surfactants derived from petroleum beyond the efficient surface and interfacial activity, reaching high tolerance ranges temperature, pH and ionic strength, biodegradability and low toxicity, which makes it a great sustainable option, demonstrating potential applications as an emulsifier, solubilizer, corrosion inhibitor, thickener. However, the high cost of production is still the main barrier in commercial competition with conventional surfactants, studies are needed on a laboratory scale and pilot, applying best design and process optimization, application of materials and processes for the purification of final product, economically viable. The present study aimed to gather information on the studies already conducted as Surfactin production on a laboratory scale, analyzing from the conditioning of the organism to the fermentation kinetics and processes applied in the purification of the biosurfactant. Since every stage of the process, were made comparison with theoretical content related to fermentation processes currently applied more. Is approaching, still, theoretical foundations of Scale up to a possible prospect for potential industrial production.

**Keywords:** Sustainability. Biotechnology. Biosurfactants. Surfactin. Scale up.

## LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Inserção da Biotecnologia em diferentes setores produtivos.....	19
Figura 2 - (A) Moléculas de surfactante em um líquido não polar e (B) Formação de micelas inversas.....	23
Figura 3 - Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética. ....	26
Figura 4 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos.....	26
Figura 5 - Estrutura de biossurfactantes do tipo glicolípídeo (A e B) e lipopeptídeo (C).....	27
Figura 6 - Funções e aplicações de biossurfactantes. ....	29
Figura 7 - Estrutura da principal isoforma da surfactina.....	33
Figura 8 - Esquema simplificado de um típico Bioprocesso. ....	34
Figura 9 -Processamento de surfactina desenvolvido com rendimento de 6000 mg/L. ....	36
Figura 10 - Substâncias que constituem o meio sintético e fontes alternativas.....	38
Figura 11 - Composição centesimal de células microbianas.....	40
Figura 12 - Equação estequiométrica envolvendo estruturas moleculares de substrato, fonte de nitrogênio, oxigênio, produto e subprodutos. ....	40
Figura 13 - Equações relacionando velocidades instantâneas.....	42
Figura 14 - Representação das variações de concentrações em um processo fermentativo no tempo t.....	43
Figura 15 - Expressões relacionando produtividade em biomassa (d) e a produtividade de produto (e). ....	43
Figura 16 - Equações denominadas velocidades específicas de crescimento (e), consumo de substrato (f) e de formação de produto (g).....	44
Figura 17 - Equação do fator de conversão de substrato em biomassa. ....	44
Figura 18 - Equação do fator de conversão de substrato em produto.....	45
Figura 19 - Equação do fator de conversão de substrato em produto.....	45
Figura 20 - Parâmetros cinéticos determinados para variadas culturas.....	46
Figura 21 - Fermentações realizadas em diferentes rotações utilizando fermentador com cubas com volume útil de 1L e suas respectivas avaliações.....	48
Figura 22 - Cinética do Processo. ....	50
Figura 23 - Fases do crescimento microbiano.....	51

Figura 24 - Sistemas diversos para transferência de oxigênio em biorreatores. ....	55
Figura 25 - Equação para o balanço de oxigênio para um biorreator em operação..	56
Figura 26 - Fermentação de 10 litros realizada em fermentador contendo meio de cultivo adicionado de glicerina residual como única fonte de carbono. ....	57
Figura 28 - Batelada com recuperação do inóculo. ....	59
Figura 27 - Batelada com um inóculo para cada biorreator. ....	59
Figura 29 - (1) Batelada seqüencial ou repetida e (2) Batelada alimentada com diferentes formas de alimentação. ....	60
Figura 30 - (3) Processo Contínuo com um único biorreator e (4) Processo Contínuo com um único biorreator e com reciclo de células. ....	60
Figura 31 - Processo Contínuo com biorreatores em série sem alimentação adicional. ....	61
Figura 32 - Processo Contínuo com biorreatores em série com alimentação adicional. ....	61
Figura 33 - Designers de Biorreatores. ....	64
Figura 34 - Critérios de ampliação de escala normalmente recomendados para biorreatores convencionais. ....	66
Figura 35 - Classificação geral dos biorreatores. ....	68
Figura 36 - Modelo de um Reator STR adaptado com cestos catalisadores. ....	69
Figura 37 - Configurações de um reator “air-lift” ....	70
Figura 38 - Biorreator Coluna de Bolhas (“bubble column”) ....	70
Figura 39 - Biorreatores com células imobilizadas. ....	71
Figura 40 - Representação Esquemática de um Tratamento de Efluentes. ....	74
Figura 41 - Etapas utilizadas na produção de enzimas de interesse industrial. ....	77

## LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABDI - Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial  
ATCC 21332 - Linhagem Modificada de Bacillus subtilis  
ATCC 6633 - Linhagem Modificada de Bacillus subtilis  
CAGR - Taxa Composta de Crescimento Anual  
CGEE - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos  
CMC - Concentração Micelar Crítica  
DO - Análise espectrofotométrica da Densidade Óptica da cultura  
Downstream Processing - Tratamentos no Final do Processo  
Glu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu - Aminoácidos Constituintes da Estrutura Molecular da surfactina. (Glu) ácido glutâmico, valina (Val), ácido aspártico (Asp) e leucina (Leu).  
INI-Biotecnologia - Iniciativa Nacional de Inovação em Biotecnologia  
LAB - Alquilbenzeno Linear  
LAS - Alquilbenzeno Linear Sulfonado  
LASNa - Alquilbenzeno Sulfonato de Sódio  
LLDLLDL - Anel heptapeptídico com sequência quiral.  
LSFM - Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana  
LSFM\_05 - Linhagem Modificada de Bacillus subtilis  
UNICAMP - Universidade de Campinas  
Upstream Processes - Tratamentos no Início do Processo  
vvm - Vazão de ar em volume de meio.

## LISTAS DE SIMBOLOS

- YP/S - Fator de conversão de substrato-produto (g produto/g substrato)
- CMC - Concentração Micelar Crítica (CMC) em mg/L
- dP/dt - Velocidade de formação de produto (g/L.h)
- dS/dt - Velocidade de consumo de substrato (g/L.h)
- dX/dt - Velocidade de variação de biomassa (g/L.h)
- $P_X$  - Produtividade em biomassa (g.L-1.h-1)
- $P_P$  - Produtividade em produto (mg.L-1.h-1)
- $X_m$  - concentração de biomassa seca (g.L-1) no tempo t de cultivo
- $X_0$  - Concentração de biomassa seca (g.L-1) no início do cultivo
- $t_f$  - Tempo de cultivo (h)
- $P_m$  - Concentração volumétrica de surfactina (mg.L-1) no tempo t de cultivo
- $P_0$  - Concentração volumétrica de surfactina (mg.L-1) no início do cultivo
- $t_{fP}$  - Tempo de cultivo (h)
- $\mu_p$  - Velocidade específica de formação de produto (h-1)
- $\mu_s$  - Velocidade específica de consumo de substrato (h-1)
- $\mu_x$  - Velocidade específica de crescimento de microrganismo (h-1)
- S - Concentração de substrato (g/L)
- $S_0$  - Concentração de substrato no tempo t = 0 (g/L)
- tg - Tempo de geração (h)
- UFC - Unidade Formadora de Colônias
- $P_{m\acute{a}x(P)}$  - Produção máxima
- $\frac{dC_L}{dt}$  - Taxa de Transferência de O<sub>2</sub>
- $\frac{P}{V}$  - Constância da potência no sistema não aerado por unidade de volume de meio
- $k_L a$  - Constância do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio
- $v_{tip}$  - Constância da velocidade na extremidade do impelidor
- $t_m$  - Constância do tempo de mistura
- $F_L/V$  - Constância da capacidade de bombeamento do impelidor
- $N_{Re}$  - Constância do numero de Reynolds
- C - Constância da pressão parcial ou concentração de O<sub>2</sub> dissolvido

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>BIOTECNOLOGIA</b> .....	<b>16</b>
3.1	DEFINIÇÃO .....	16
3.2	PERSPECTIVAS .....	17
<b>4</b>	<b>SURFACTANTES</b> .....	<b>22</b>
4.1	DEFINIÇÃO .....	22
4.2	SURFACTANTES CONVENCIONAIS .....	23
4.3	BIOSURFACTANTES .....	24
4.3.1	Propriedades e aplicações.....	27
4.3.2	surfactina.....	32
<b>5</b>	<b>PRODUÇÃO DE SURFACTINA EM ESCALA DE LABORATÓRIO</b> .....	<b>34</b>
5.2	AGENTE BIOLÓGICO E MEIO DE CULTIVO.....	36
5.3	CINÉTICA DO PROCESSO .....	41
5.3.1	Velocidades instantâneas de transformação.....	42
5.3.2	Curvas de crescimento .....	51
5.4	VARIÁVEIS DO PROCESSO .....	53
5.4.1	pH e temperatura .....	53
5.4.2	Oxigenação .....	54
5.4.3	Agitação .....	56
5.5	CONDUÇÃO DO PROCESSO NO BIORREATOR .....	58
5.5.1	Tipos de condução .....	58
5.6	PROCESSOS PARA A RECUPERAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO. ....	61
<b>6</b>	<b>AVALIAÇÃO PARA VARIAÇÃO DE ESCALA DE PRODUÇÃO</b> .....	<b>65</b>
6.1	SCALE UP .....	65
6.2	BIORREADORES DE ESCALA INDUSTRIAL .....	66
6.2.3	Tipos e classificação .....	67
6.4	PROCESSOS DE SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO .....	72
6.5	TRATAMENTO BIOLÓGICO DE RESÍDUOS E EFLUENTES .....	73
6.6	PROJEÇÃO DE PROCESSO .....	75
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>78</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>80</b>
	<b>ANEXO A - Meios de Cultivo</b> .....	<b>84</b>
	<b>ANEXO B - Correlações</b> .....	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Sem dúvida, os surfactantes são um dos compostos químicos mais importantes para o homem. O mesmo está presente em vários setores industriais como, por exemplo: na indústria de produtos de limpeza (sabões e detergentes), petróleo, alimentos, cosméticos e produtos higiene, têxtil, óleos, entre outras.

A produção mundial de surfactantes excede 3 milhões de toneladas por ano. (BANAT, 2000 *apud* NITSCHKE; PASTORE, 2002). Como a grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo, o crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente levou à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes. (NITSCHKE; PASTORE, 2003). Assim, os problemas ambientais oriundos das práticas comerciais e industriais repercutem nos meios de comunicação e, conseqüentemente, coloca a preservação do meio ambiente na agenda de prioridades imediatas. Com isso, o ideal de sustentabilidade entra em cena relacionando as atividades humanas e seus mecanismos de interação ou produção de bens com a natureza.

Dessa forma, a biotecnologia surge como uma ferramenta sustentável contra os problemas ambientais causados pelos surfactantes derivados do petróleo, sendo amplamente aplicada nas pesquisas de desenvolvimento dos biossurfactantes. Sendo esta, uma importante ferramenta de sustentação de uma moderna revolução agrícola e industrial e a chave de retomada do crescimento, alavancando o pleno desenvolvimento do Brasil (BRASIL, 2010a).

Segundo Banat *et al.* (2000 *apud* ARAUJO, 2013), os compostos de origem microbiana que apresentam propriedades surfactantes como a diminuição da tensão superficial e alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos filamentosos e leveduras.

Os lipopeptídeos são os mais estudados atualmente, pois apresentam grande potencial industrial. A surfactina, como é usualmente chamado, um dos biossurfactantes aniônicos mais potentes produzidos a partir de *Bacillus subtilis*. Dentre a diversidade de composição química e propriedades dos biossurfactantes, algumas características são comuns e agregam vantagens sobre os surfactantes

sintetizados a partir do petróleo, como a atividade superficial e interfacial, tolerância à temperatura, pH e força iônica; biodegradabilidade e baixa toxicidade. (Nitschke e Pastore, 2002)

O processamento da surfactina é constituído, basicamente, do condicionamento do microrganismo no processo de preparo da cultura e do meio (“Upstream Processes”); posteriormente o meio é direcionado ao Biorreator no qual ocorre a biotransformação e, por fim, os processos de separação e purificação do produto (“Downstream Processes”). Schmidell (2001) destaca que o sucesso fermentativo depende basicamente do microrganismo utilizado, do meio de cultura, a forma de condução do processo e as etapas de recuperação do produto, e declara ainda que essas etapas interagem intensamente sendo necessário descrevê-las de forma conjunta e levando em consideração os aspectos biológicos e econômicos.

Dessa forma, o trabalho teve o intuito de reunir informações do processamento desse potente biosurfactante em escala de laboratório, analisando o condicionamento do microrganismo, a cinética apresentada na etapa de fermentação e, ainda, os métodos aplicados na recuperação do produto final. Foram efetuados comparativos com conteúdos teóricos referentes à processos fermentativos. Contudo, após a realização desse comparativo teórico e experimental, foi realizada uma prospecção de variação de escala de produção, abordando fundamentos teóricos de Scale up e equipamentos com potencial industrial.

## 2 OBJETIVOS

Estudar o planejamento e controle da produção do biossurfactante surfactina em escala de laboratório e em seguida analisar as variáveis do processo avaliando a possibilidade de aplicação de scale up, envolvendo:

- A conceituação da Biotecnologia como tendência na produção de substâncias químicas e processos sustentáveis;
- A elaboração de um comparativo econômico e ambiental sobre os Biossurfactantes em relação aos Surfactantes Sintéticos;
- O estudar das características físico-químicas da surfactina e apresentar seu potencial industrial;
- A análise das variáveis do bioprocessamento da surfactina em escala de laboratório, aplicando conceitos teóricos de processos fermentativos e modelagem matemática;
- A projeção do processamento da surfactina em escala industrial, abordando o planejando e controle da produção a partir dos conceitos “Upstream Process” e “Dowstream Process”.

### 3 BIOTECNOLOGIA

#### 3.1 DEFINIÇÃO

O termo sustentabilidade está, atualmente, relacionado em todas as atividades humanas. Seja em casa, na rua, nas empresas ou no meio acadêmico, buscam-se sempre mecanismos de interação ou produção de bens que se propagam de forma harmoniosa com a natureza. Com isso, a biotecnologia surge como uma ferramenta sustentável contra os problemas ambientais causados pelos surfactantes derivados do petróleo, sendo amplamente aplicada nas pesquisas de desenvolvimento dos biosurfactantes.

Os vários conceitos da Biotecnologia referem-se ao uso de células ou sistemas bioquímicos em processos de produção de bens ou de prestação de serviços. Neste contexto, a Biotecnologia tem papel destacado, sob o ponto de vista histórico e tecnológico, visto que os primeiros processos industriais basearam-se na ação de microrganismos e a grande maioria daqueles consagrados utiliza microrganismos nativos ou modificados geneticamente. (PEREIRA JUNIOR; BON; FERRARA, 2008)

Para Andrade (2011) a maioria das definições de biotecnologia engloba conceitos voltados à aplicação em processos biológicos, com o objetivo de criar possibilidades (novos produtos e processos) e resolver problemas ambientais, como a utilização de resíduos industriais. Está embasada na agricultura, medicina e ciências de alimentos, esta última com infindáveis possibilidades como: novas linhagens, coprodução, engenharia metabólica, atividades fisiológicas e antimicrobiana de bioprodutos, suplementação de resíduos agroindustriais, etc.

A Biotecnologia vem cada vez mais conquistando espaço diante das discussões relacionando o setor industrial, acadêmico e governamental. Segundo Ribeiro Filho (2009), pelos benefícios proporcionados pela Biotecnologia à humanidade ela se encontra com grande presença na mídia. Cita, ainda, a participação da Biotecnologia nas constantes descobertas e novos produtos lançados no mercado, como: alimentos; cosméticos; medicamentos; processos terapêuticos; testes de diagnósticos e biocombustíveis.

Sua aplicação é, sem dúvida, muito importante para os processos químicos da atualidade. Segundo Pereira Junior; Bon e Ferrara (2008) trata-se de uma área muito extensa, abordando processos, produtos e serviços, aplicando diferentes microrganismos para a produção de substâncias de interesse comercial, como: antibióticos, ácidos orgânicos, solventes, enzimas e biocombustíveis por processos fermentativos. Destaca ainda, que o produto pode ser o próprio microrganismo, como a produção de levedura de panificação e inoculantes agrícolas, ou células microbianas, que podem ser utilizadas em processos de biotransformação, como por exemplo, para a produção de esteróides, aromas e fragrâncias. Ressalta que além da produção de bens de consumo, os microrganismos são também utilizados em processos de tratamento de resíduos e efluentes urbanos e industriais, na recuperação de metais, tais como cobre, chumbo e urânio, ou em processos de biorremediação de solos contaminados.

Sua aplicação está em inúmeros processos industriais e entre os considerados mais importantes para a humanidade. Temos como exemplo: a indústria farmacêutica - na produção de antibióticos, hormônios, vacinas, vitaminas e proteínas terapêuticas humanas; a indústria de alimentos - na produção aminoácidos, flavorizantes, polissacarídeos e gomas xantana; e a indústria química - na produção de etanol, acetona, butanol, glicerol, ácido láctico, ácido cítrico, poliésteres, inseticidas microbianos.

A crescente repercussão dos problemas ambientais advindos das práticas comerciais e industriais coloca a preservação do meio ambiente na agenda de prioridades imediatas. Os problemas de contaminação do solo, água e atmosfera, seja numa escala local ou global, influenciam, normalmente de forma negativa, a vida de um grande número de pessoas. Assim, a biotecnologia ambiental pode ser a sustentação de uma moderna revolução agrícola e industrial e a chave de retomada do crescimento, alavancando o pleno desenvolvimento do Brasil. (BRASIL, 2010a).

### 3.2 PERSPECTIVAS

Tendo como base a Convenção sobre Diversidade biológica de 1992, Ribeiro Filho (2009) considerou a biotecnologia como um conjunto de tecnologias que utilizam sistemas biológicos, organismos vivos e/ou seus derivados para a

produção ou modificação de produtos e processos específicos, bem como para gerar novos serviços de alto impacto em diversos segmentos industriais. O conceito de biotecnologia moderna tem sido mais utilizado, envolvendo o uso de engenharia genética para a manipulação de genes na produção de anticorpos, no desenho de drogas, na modificação genética de plantas e animais (transgênicos), entre outros.

Atualmente novos produtos já estão sendo pesquisados e projetados focando a grande relação da biotecnologia com o meio ambiente. Ela pode ser compreendida, assim, como a aplicação de microrganismos e seus componentes em processos industriais e comerciais, com o intuito de reduzir os efeitos negativos dos resíduos sólidos, líquidos ou gasosos que são liberados no meio ambiente por esses processos. (BRASIL, 2010a)

A biotecnologia segue com base na busca e descoberta de recursos biológicos industrialmente exploráveis. Uma abordagem clássica das etapas do processo de busca e descoberta desta técnica passa resumidamente pela coleta de material biológico adequado, seguida da seleção e triagem de materiais com os atributos desejados, seleção final do melhor candidato a partir de uma lista reduzida de opções e culmina com o desenvolvimento de um produto comercial ou processo industrial. (BULL *et al.*, 2000 apud BARBOSA, 2011).

Seu desenvolvimento tem grande importância para o Brasil, tanto quanto para o mundo, tendo em mente o inter-relacionamento entre o desenvolvimento industrial e a preservação do meio ambiente. Segundo Pereira Junior, Bon e Ferrara (2008) sabe-se que o Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades do planeta e que seu território possui recursos hídricos correspondentes a 12% da água doce do planeta, incluindo o Aquífero Guarani, que é o maior do mundo. São esses os recursos naturais mais importantes para a humanidade a partir deste século, representando um ativo de valor incalculável. Essas riquezas, patrimônio da sociedade brasileira, devem ser preservadas da poluição ambiental provocada por práticas inadequadas de diferentes setores industriais e agroindustriais.

Tem Kate (1999 apud BARBOSA, 2011) ressalta que a biotecnologia é reconhecida como uma das tecnologias com potencial para o século XXI, tendo em vista suas características de inovação radical, impacto atual e potencial frente a problemas globais, tais como: doenças, desnutrição e poluição ambiental. Para Bull *et al.* (1998 apud BARBOSA, 2011) a biotecnologia pode ser vista como um

excelente recurso de desenvolvimento industrial sustentável, seja na utilização de recursos renováveis, tecnologias limpas ou na redução do aquecimento global.

Pela gama de aplicações e interação com diversos ramos da ciência a biotecnologia é vista como promissora nos processos industriais do futuro. Segundo Ribeiro Filho (2009) a biotecnologia tem grande multidisciplinaridade e transversalidade, podendo envolver e convergir à aplicação de conhecimentos de diversas disciplinas e áreas, como a fisiologia humana e vegetal, bioquímica, genética, informática, física, matemática, agricultura, agropecuária, estatística entre outras.

Pereira Junior; Bon e Ferrara (2008) dizem ainda que em decorrência das várias aplicações de seus produtos, a biotecnologia insere-se em uma gama de segmentos industriais:

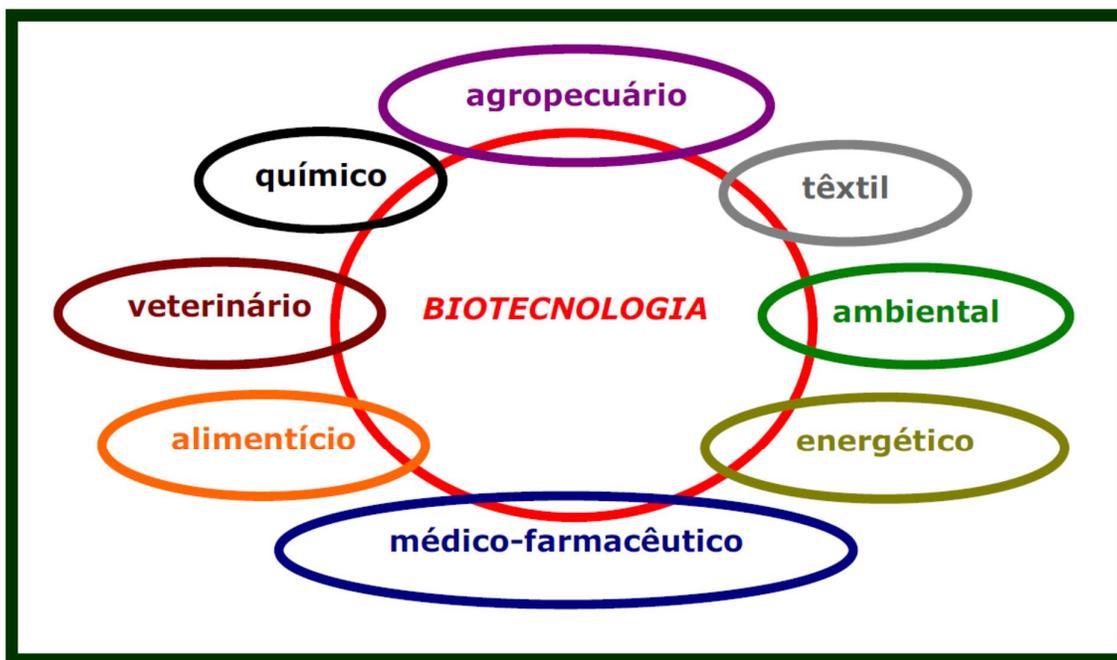


Figura 1- Inserção da Biotecnologia em diferentes setores produtivos.  
Fonte: Pereira Junior, Silva Bon e Ferrara (2008).

O Brasil apresenta grandes perspectivas nas áreas já comentadas, porém, de acordo com especialistas, existem ainda grandes lacunas nos pilares principais para a eficiência e eficácia da biotecnologia, que são: os recursos humanos, infraestrutura, investimentos, aspectos de mercado e marcos regulatório.

Segundo Brasil (2010b) um o estudo realizado pela Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI) e o Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE), com o objetivo de subsidiar a Iniciativa Nacional de Inovação em Biotecnologia (INI-Biotecnologia), o mercado global nesta área cresceu no período 2002-2006 a uma taxa composta de crescimento anual (CAGR) de 13,4% e gerou receitas de US\$ 153,7 bilhões no ano de 2006, para uma base de US\$ 92,9 bilhões em 2002. As Américas lideram o mercado global de biotecnologia, respondendo por 58,3% das receitas geradas em 2006. Em segundo lugar, situa-se a região da Ásia e Pacífico que gerou 23,9% das receitas globais no ano de 2006. Atualmente existem 139 setores distintos que utilizam a biotecnologia em seus produtos ou serviços. Em 2006, o setor de medicina e saúde humana foi o que mais se destacou, gerando receitas de US\$96,2 bilhões, equivalentes a 62,5% do valor do mercado global de biotecnologia. Os setores de agricultura e alimentos contribuíram com receitas de US\$ 17,7 bilhões nesse mesmo ano, correspondendo a uma participação de 11,5% do mercado de biotecnologia.

Também foi possível observar no estudo que Brasil ocupa o 5º lugar entre os países que mais empregam no setor de biotecnologia, seja em empresas privadas, públicas ou em institutos de pesquisas, após China, Suécia, Japão e Dinamarca. Embora tenha grande potencial em termos de desenvolvimento e pesquisa na área de biotecnologia, o Brasil ainda não apresentou indicadores significativos no que se refere à incorporação desse conhecimento em produtos e processos, em escala industrial. De fato, no período 1998-2007, o Brasil situou-se em posições bastante favoráveis em relação à produção científica mundial em 14 temas de áreas de fronteira abordados, situação que não se repetiu quando foram pesquisados os indicadores de propriedade intelectual no mesmo período. Foram identificadas 181 empresas de biociências (ou ciências da vida), 71 das quais formam o conjunto de empresas de biotecnologia. Essas 71 empresas foram classificadas em sete categorias setoriais: saúde humana, saúde animal, agricultura, meio ambiente, bioenergia, insumos e misto.

A pesquisa indicou, ainda, que 78,8% das empresas pesquisadas atuam em quatro áreas principais, a saber: agricultura (22,5%), insumos (21,1%), saúde animal (18,3%) e saúde humana (16,9%). Deve-se destacar um importante subgrupo de empresas que é formado por micro e pequenas empresas incubadas, as quais por serem nascentes, *start-ups*, encontram-se em uma situação especial do ponto de

vista de suas relações com o mercado, universidades e centros de pesquisa científica, os quais em sua maioria abrigam as incubadoras.

Do universo estudado de 71 empresas atuantes em biotecnologia, 25 são incubadas e representam 35,2% do conjunto total. Sua distribuição geográfica mantém o padrão de concentração na Região Sudeste, porém podem ser identificadas significativas diferenças em relação ao conjunto como um todo: o predomínio absoluto de São Paulo, que concentra quase metade do total de empresas incubadas no país (48%) e Minas Gerais em segundo lugar (24%). Convém também destacar que as empresas incubadas estão localizadas em apenas seis estados, revelando-se um expressivo grau de concentração (BRASIL, 2010b).

## 4 SURFACTANTES

### 4.1 DEFINIÇÃO

Surfactante é uma palavra derivada da contração da expressão *surface active agent*, termo que significa, literalmente, agente de atividade superficial. Os surfactantes são compostos anfífilos que reduzem a energia livre do sistema pela substituição das moléculas de mais alta energia situado na interface. Podemos considerar um surfactante como um composto caracterizado pela capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido. A interface pode ser vista como o limite entre duas fases imiscíveis, enquanto o termo superfície indica que uma das fases é gasosa. Outras propriedades fundamentais dos surfactantes é a tendência de formar agregados chamados micelas (Figura 2) que, geralmente, formam-se a baixas concentrações em água, além de serem responsáveis pela redução da tensão interfacial e superficial da mesma. Moléculas situadas no interior de um líquido sofrem atrações por todas as direções pelas moléculas vizinhas, enquanto que as moléculas da superfície do líquido sofrem apenas atração lateral e inferior. Esta força para o lado e para baixo cria a tensão na superfície, que faz a mesma comportar-se como uma película elástica (MULLIGAN, 2005 apud BARBOSA, 2011).

Resumidamente, os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica, onde sua porção apolar é frequentemente uma cadeia de hidrocarbonetos enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica. Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo) (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

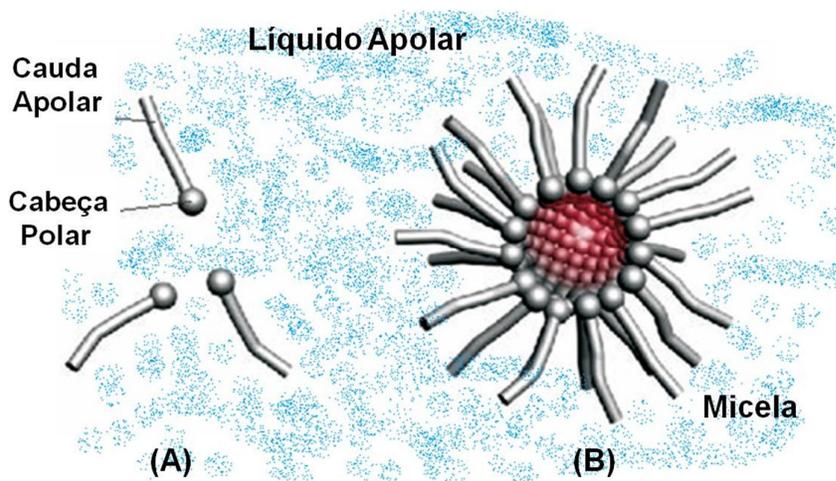


Figura 2 - (A) Moléculas de surfactante em um líquido não polar e (B) Formação de micelas inversas.

Fonte: Filip, Filip e Kristiaan (c2013).

Nota: Adaptado pelo autor.

Estas propriedades possibilitam que surfactantes estejam presentes numa ampla gama de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases. Eles são usados devido a sua capacidade de diminuir as tensões superficiais, aumentar a solubilidade e a molhabilidade além de potencializar o poder detergente e espumante. Com a presença do surfactante, menor trabalho é requerido para trazer uma molécula para a superfície e a tensão superficial é reduzida (MULLIGAN, 2005 apud BARBOSA, 2011).

#### 4.2 SURFACTANTES CONVENCIONAIS

A maior parte dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada quimicamente a partir de derivados do petróleo sendo ecologicamente nocivos, uma vez que são de difícil degradação. Como grande exemplo, o Alquilbenzeno Linear (LAB) um intermediário petroquímico básico para a produção de Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS), o precursor do tensoativo Linear Alquilbenzeno Sulfonato de Sódio (LASNa) amplamente aplicado em formulações de detergentes que por sua vez vem causando poluição em corpos receptores, estações de tratamento e efeitos biológicos adversos a microrganismos aquáticos devido a toxicidade do surfactante. Outros exemplos são: Dietanolamida de Ácido Graxo de Coco (Amida 60), um

surfactante não iônico compatível com a maioria dos tensoativos aniônicos, catiônicos, anfotéricos, sendo indicado para fabricação de detergentes líquidos e produtos de limpeza em geral, proporcionando espessamento, ação emoliente, sobreengordurante, devolvendo a oleosidade natural da pele. Como também o Álcool Polivinílico (Viscopon), um espessante sintético apropriado para uso em detergentes líquidos e similares, compatível com a maioria dos tensoativos aniônicos, não iônicos, catiônicos e anfóteros utilizados em formulações de produtos domissanitários na função de espessante (TEBRAS, c2013).

A produção mundial de surfactantes excede 3 milhões de toneladas por ano. Banat (2000 apud NITSCHKE; PASTORE, 2002) Como a grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente são sintetizados a partir de derivados de petróleo, o crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente levaram à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (NITSCHKE; PASTORE, 2003).

#### 4.3 BIOSSURFACTANTES

Muitos compostos com propriedades surfactantes podem ser obtidos de forma natural sendo sintetizados a partir de plantas, microrganismos e também no organismo humano pelos sais biliares. Ainda assim, Segundo Banat *et al.* (2000 apud ARAUJO, 2013), os compostos de origem microbiana que apresentam propriedades surfactantes como a diminuição da tensão superficial e alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos filamentosos e leveduras.

O Biossurfactante é um grupo heterogêneo de moléculas tensoativas produzidas por microrganismos. Estas moléculas também reduzem a tensão superficial, concentração micelar crítica (CMC) e tensão interfacial tanto de soluções aquosas quanto de misturas de hidrocarbonetos. Estas propriedades criam emulsões nas quais a formação de micelas ocorre na região onde hidrocarbonetos podem se solubilizar em água, e a água em hidrocarbonetos. Sua biodegradabilidade é um de seus recursos mais importantes porque impede problemas de acumulação e toxicidade nos ecossistemas naturais, uma vez que a habilidade dos biossurfactantes de emulsionar misturas de água e hidrocarboneto

potencializa a degradação destes no ambiente. Também possui maior estabilidade mesmo quando sujeito às grandes variações de temperatura, pH e força iônica, podendo ser utilizado em ambientes com condições mais extremas, sendo estas algumas das vantagens sobre os surfactantes sintetizados quimicamente (BANAT, 2000 apud BARBOSA, 2011).

Os primeiros relatos envolvendo a utilização de biossurfactantes datam de 1949 quando os cientistas Jarvis & Johnson detectaram as atividades antibiótica e hemolítica de um ramnolípídeo, e quando em 1968 Arima e sua equipe descobriram a existência de um novo composto biologicamente ativo produzido por *Bacillus subtilis*, denominado surfactina por apresentar grande atividade superficial, e logo teve sua estrutura elucidada. Após um período, foi registrada a produção de biossurfactante em meios hidrofóbicos, o que levou a estudos de sua aplicação em tratamento de resíduos de petróleo, recuperação de petróleo, biorremediação e dispersão no derramamento de óleos. (BARBOSA, 2011).

De acordo com Matsuura (2004), os Biossurfactantes podem ser classificados com base no maior grupo funcional disponível na estrutura ou de acordo com o microrganismo produtor. Ainda, segundo Desai (1993 apud NITSCHKE; PASTORE, 2002) fazem parte de uma das principais classes de surfactantes naturais (Figura 3). Existe uma enorme variedade de grupamentos ou componentes que fazem com que se tenha um grande número de biossurfactantes estruturalmente diferentes sintetizados de uma variedade de microrganismos (Figura 4). Entre os grupos mais importantes, Desai *et al.* (1993 apud NITSCHKE; PASTORE, 2002) inclui os Glicolípídios e Lipopeptídios (Figura 5), Lipoproteínas, Fosfolípídios e Ácidos graxos, Surfactantes Poliméricos e Surfactantes Particulados. Sua porção lipofílica é usualmente composta por cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, variando entre saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados. A parte hidrofílica, solúvel em água, de um biossurfactante pode ser um carboxilato, um grupo hidróxi ou uma mistura complexa como fosfato, carboidrato, aminoácidos, etc. (DESAI e BANAT, 1997; ARAUJO e FREIRE, 2013). Grande parte dos biossurfactantes é neutra ou carregada negativamente variando de pequenos ácidos graxos até grandes polímeros. Nos biossurfactantes aniônicos, a carga é devido a um carboxilato e/ou fosfato ou, ocasionalmente, a um grupo sulfato. Sendo que, ainda, um pequeno grupo de biossurfactantes catiônicos contém grupamentos amino.

Naturais	Sintéticos
Alquil poliglicosídeos	Alcanolaminas
Biossurfactantes	Alquil e aril éter carboxilatos
Amidas de ácidos graxos	Alquil aril sulfatos
Aminas de ácidos graxos	Alquil aril éter sulfatos
Glucamidas	Alquil etoxilados
Lecitinas	Alquil sulfonatos
Derivados de proteínas	Alquil fenol etoxilados
Saponinas	Aminoóxidos
Sorbitol e ésteres de sorbitan	Betaínas
Ésteres de sacarose	Co-polímeros de óxido de etil/propileno
Sulfatos de álcoois graxos naturais	Ácidos graxos etoxilados

Figura 3 - Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética. Fonte: Desai e Banat (1997 apud NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Tipo de Biossurfactante	Microrganismo
Glicolipídios	
- ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
- soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola, T. apicola</i>
- trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis, Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídios e lipoproteínas	
- Peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
- Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
- Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
- Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios	
- Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
- Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
- Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
- emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- liposan	<i>Candida lipolytica</i>
- carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
- vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- células	Várias bactérias

Figura 4 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos. Fonte: Desai e Banat (1997 apud NITSCHKE; PASTORE, 2002)

Como observado na Figura 4 os biossurfactantes podem ser sintetizados a partir de uma variedade de microrganismos, e, segundo Desai e Banat (1997 apud

Araujo e Freire, 2013), a produção predomina durante o crescimento em substratos insolúveis em água. Ainda que a função fisiológica dos biossurfactantes não tenha sido completamente elucidada, têm-se estabelecido algumas funções como emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, transporte de hidrocarbonetos, aderência-liberação da célula a superfícies e atividade antibiótica (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

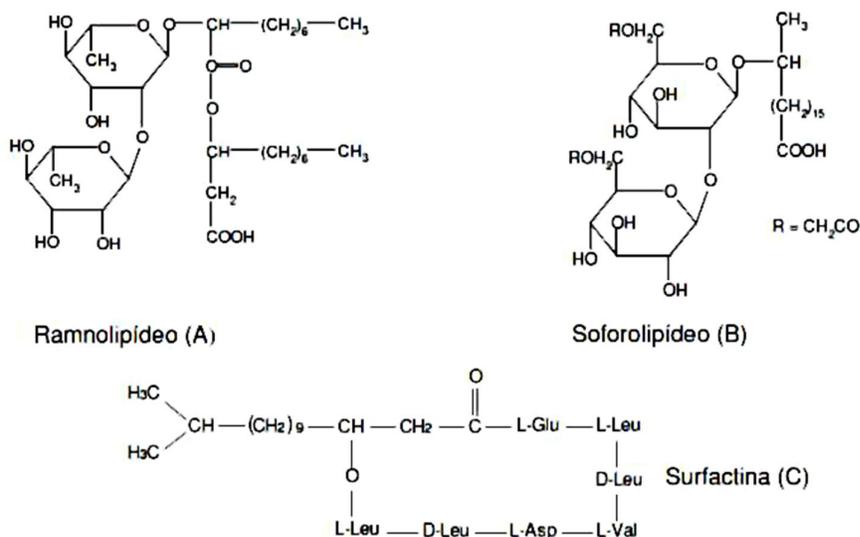


Figura 5 - Estrutura de biossurfactantes do tipo glicolípídeo (A e B) e lipopeptídeo (C).

Fonte: (MATSUURA, 2004)

#### 4.3.1 Propriedades e aplicações

Dentre a diversidade de composição química e propriedades dos biossurfactantes, algumas características são comuns e agregam vantagens sobre os surfactantes sintetizados a partir do petróleo, como a atividade superficial e interfacial: podendo ser mais eficientes e mais efetivos por produzirem menor tensão superficial com menores concentrações de produto; tolerância à temperatura, pH e força iônica: por apresentarem elevada estabilidade térmica, de pH e de concentrações salinas, potencializando aplicações em ambientes com condições drásticas; biodegradabilidade: por serem facilmente degradados em água e no solo; baixa toxicidade: podendo ser aplicado em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Essas propriedades são ainda mais definidas por Bognolo (1999 apud BARBOSA, 2011), no qual destaca algumas vantagens dos surfactantes naturais em relação aos sintéticos:

- Atividade de superfície e interface: os biossurfactantes são mais efetivos e eficientes que, por exemplo, sulfonatos aniônicos, já que reduzem a tensão superficial mais rapidamente. Os biossurfactantes de alta massa molecular adsorvem na interface óleo/água através de múltiplos pontos de ancoragem, aumentando a estabilidade das cadeias em uma única fase, o que produz uma efetiva estabilidade estérica. A grande área interfacial coberta pela molécula adsorvida e a multiplicidade de pontos de ancoragem asseguram que não ocorra dessorção durante a colisão de partículas, e aumentam grandemente a estabilidade das emulsões;
- Tolerância à temperatura: alguns biossurfactantes e sua atividade superficial não são afetados, mesmo a altas temperaturas (90°C);
- Tolerância à força iônica: os biossurfactantes não precipitam em soluções salinas de até 10%, enquanto que soluções de 2-3% de sal são suficientes para desativar os surfactantes químicos;
- Biodegradabilidade: os biossurfactantes são facilmente degradados na água ou no solo; emulsões feitas com biossurfactantes podem ser facilmente quebradas por adição de enzimas, como, por exemplo, a depolimerase, que pode quebrar a emulsão de hidrocarbonetos em óleo.

A potencial aplicação dos surfactantes produzidos a partir de microrganismos é baseada nas propriedades de emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Essas propriedades possibilitam a aplicação em indústrias como a de alimentos, a agrícola, de construção, de bebidas, de celulose e papel, de metal, têxtil, farmacêutica, de cosméticos e de petróleo (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Segundo Van Dike e Lee (1991 apud NITSCHKE; PASTORE, 2002) o maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, na qual são utilizados na

produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes. Nitschke e Pastore (2002) incluem outras aplicações como biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a recuperação melhorada de petróleo. Distribuindo, atualmente, entre os mais diversos setores industriais. (Figura 6)

Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Seqüestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos

Figura 6 - Funções e aplicações de biossurfactantes.

Fonte: Banat (2000 apud NITSCHKE; PASTORE, 2002).

O alto custo de produção ainda é o grande obstáculo que torna os biossurfactantes incapazes de competir comercialmente com os surfactantes químicos, porém é o que estimula o desenvolvimento de novas pesquisas para reduzir estes valores (PATEL; DESAI, 1997 *apud* BARBOSA, 2011). Assim, muitos estudos visando um menor custo na produção dos biossurfactantes vêm sendo feitos, envolvendo o dimensionamento do processo, como também, a aplicação de matérias-primas mais baratas, sendo que estas chegam a até 30% do custo total (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998 *apud* NITSCHKE; PASTORE, 2003).

Nitschke e Pastore (2003) destacam a vantagem dos biossurfactante em poderem ser sintetizados através da aplicação de resíduos agroindustriais como substrato. Ainda que, a dificuldade na seleção de um resíduo está em encontrar a composição adequada de nutrientes que permita o crescimento celular e o acúmulo do produto de interesse. Em geral, substratos agroindustriais que contenham altos níveis de carboidratos ou de lipídeos suprem a necessidade de fonte de carbono

para a produção de biossurfactantes. O estabelecimento de um processo biotecnológico a partir desses substratos alternativos também apresenta outra dificuldade, que é a padronização devido às variações naturais de composição, bem como os custos de transporte, armazenagem e tratamentos prévios necessários. Entretanto, deve-se considerar que o Brasil é um país essencialmente agrícola e que, portanto, a quantidade e a facilidade de acesso aos subprodutos agroindustriais são bastante significativas.

Assim, a aplicação de matérias-primas ou resíduos orgânicos agroindustriais é uma das atuais ferramentas com a possibilidade de reduzir os custos de produção dos biossurfactantes, sendo que milhões de toneladas de resíduos são gerados a cada ano em todo o mundo, com destaque o Brasil que tem amplo setor agroindustrial e ao mesmo tempo o custo de tratamento dos mesmos é altíssimo.

Muitos estudos em escala de laboratório e piloto que avaliam a aplicação de substrato renovável já foram concluídos, a exemplo Nitschke e Pastore (2003) utilizaram melão, soro de leite e manipueira (resíduo líquido proveniente da fabricação de farinha de mandioca) na produção de biossurfactantes a partir de *Bacillus subtilis*, e concluíram que a manipueira teve o maior potencial para uso como substrato alternativo, sendo que o composto obtido apresentou capacidade para uso em biorremediação de poluentes e em recuperação de petróleo.

Costa; Nitschke e Contiero (2008) selecionaram microrganismos com capacidade de produzir biossurfactantes a partir de resíduos de óleos e gorduras gerados em restaurantes e indústrias alimentícias, entre eles borra de soja, gordura de frango, gordura vegetal hidrogenada e óleo de soja usado em frituras foram estudados como fonte de carbono. Dentre os resíduos propostos, a borra de soja foi considerada o melhor substrato, gerando  $9,69 \text{ g.L}^{-1}$  de ramnolipídios e uma tensão superficial de  $31 \text{ mN/m}$ .

Utilizando como fonte de carbono o glicerol, um dos principais subprodutos na produção de biodiesel, Faria (2010) estudou o *Bacillus subtilis* LSFM\_05 para a produção de biossurfactantes com o intuito de viabilizar a produção em larga escala, efetuando experimentos em escala piloto de até 10L com um rendimento de  $0,69 \text{ g.L}^{-1}$ . Barros (2011) efetuou o processo fermentativo pela bactéria *Bacillus subtilis* usando como meio de cultura a manipueira, resultando na produção simultânea de lipopeptídios biossurfactantes, os compostos voláteis acetoína e diacetil e as enzimas do grupo das amilases e proteases. Lima Junior (2012) a partir do micro-

organismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633 utilizando meio de cultivo contendo melaço de soja com diferentes concentrações de açúcares totais, 2%, 4% e 6%, obtendo, no meio contendo melaço de soja com 2% açúcares totais, o rendimento de  $136 \pm 9,28$  mg.L<sup>-1</sup> de surfactina e fator de conversão de substrato em produto (YP/S) de 8,53 no tempo de 36 h.

Segundo Healy; Devine e Murphy (1996) diversas aplicações industriais de biossurfactantes têm sido projetada, porém, o principal fator limitante é a economia da produção em larga escala, sendo que as principais desvantagens são:

- baixos rendimentos do substrato aplicado no processo;
- alto investimento financeiro;
- as reações são realizadas em solução diluída para que haja eficiência de volume fraco para a planta;
- necessidade de esterilização;
- os problemas no controle do processo, por exemplo, a formação de espuma;
- os problemas na recuperação e purificação do produto;
- dificuldades na análise dos produtos acabados quimicamente devido à sua complexa natureza.

Contudo, além da aplicação de substratos renováveis como já citado anteriormente e outros meios, para Kosaric *et al.* (1984 apud Makkar & Cameotra, 2002) existem quatro fatores que podem ser considerados a fim de reduzir custos relacionados à produção de biossurfactantes, são eles: os microrganismos (seleção, adaptação e engenharia para altos rendimentos de produtos), o processo (seleção, adaptação ou engenharia para baixo capital e operação de custos), o substrato para crescimento do microrganismo ou estoque na alimentação (adaptado para baixos custos) e o processo de aumento de valor agregado dos subprodutos. Proporcionando assim, boas perspectivas num futuro próximo.

### 4.3.2 Surfactina

Dentre a diversidade de biossurfactantes já citados anteriormente, os lipopeptídeos são os mais estudados atualmente, pois apresentam grandes potenciais industriais. A surfactina, como é usualmente chamado, um dos biossurfactantes aniônicos mais potentes, produzida a partir de *Bacillus subtilis*. Foi inicialmente descrito em 1968, por Arima, Kakinuma e Tamura, e foi assim denominado devido seu caráter surfactante bastante evidente, no entanto, só começou a ser explorado a partir de 1980. Segundo Araujo e Freire (2013) ela possui a capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27,9 mN/m em concentrações tão baixas quanto 0,005% e é constituída de sete aminoácidos (Glu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu).

Estruturalmente a surfactina é constituída de um ácido graxo unido por uma ligação lactônica a um heptapeptídeo cíclico (Figura 7), encontrada como um complexo de isoformas variável. Apresenta uma estrutura comum com extensão de cadeia do ácido graxo de 12 a 17 carbonos, anel heptapeptídico com sequência quiral (LLDLLDL) de diferentes aminoácidos, sendo na posição 3 e 6 do anel apresentando sempre o D-leucina e na posição 4 L-ácido aspártico. Kakinuma; Hori e Isono (1969 *apud* LIMA JUNIOR, 2012).

A surfactina é um biossurfactante produzido principalmente por microorganismos do gênero *Bacillus*, que foi a primeira espécie mencionada e a mais estudada para produção nos dias de hoje (LIMA JUNIOR, 2012). Após a descoberta da surfactina, o gênero *Bacillus* passou a ser bastante aplicado em pesquisas relacionadas à produção de biossurfactantes, sendo crescente a procura por novas fontes dessas biomoléculas que apresentem alta eficácia e rendimento, aliado a um baixo custo de produção (FELIX, 2012).

Por sua natureza anfifílica, a surfactina torna-se solúvel em solventes polares e apolares. Sendo capaz, como Barros; Quadros e Pastore (2007), de alterar as propriedades físico-químicas de interfaces podendo assim atuar como antibióticos, agentes antivirais e antitumorais, imunomoduladores ou inibidores de enzimas e toxinas.

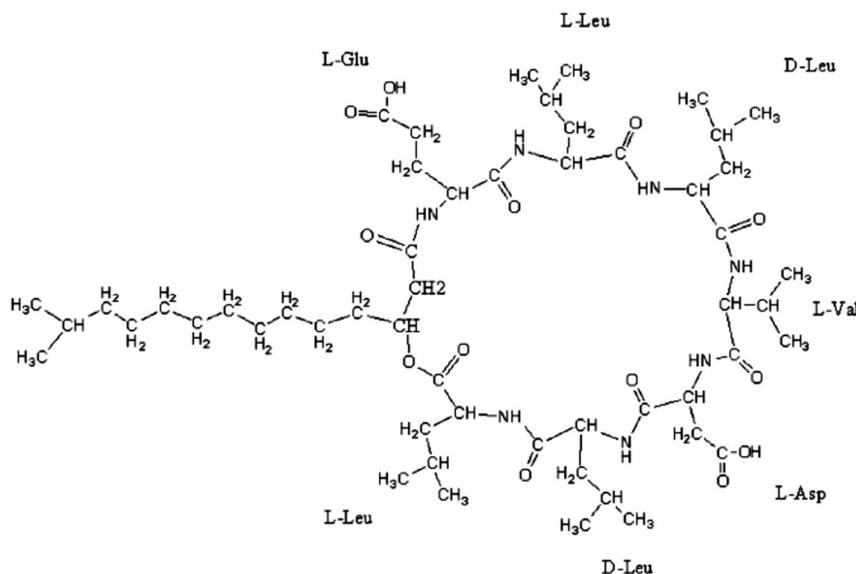


Figura 7 - Estrutura da principal isoforma da surfactina..  
 Fonte: (BARROS; QUADROS; PASTORE, 2007).

Contudo, há potencial de aplicação da surfactina em diversas áreas, como em solo e águas contaminados apresentando a capacidade de emulsionar derivados de petróleo os quais apresentam potencial de contaminação. Por exemplo, por meio da diminuição da concentração micelar crítica produzida por ramnolipídios e surfactina é possível promover a redução da tensão superficial, favorecendo a biodegradabilidade do diesel em sistemas de águas contaminadas (Whang *et al*, 2008). A remoção de metais pesados ocorre pela sorção do biosurfactante na superfície do solo e a complexação do metal, deslocando o metal para a solução que contém o surfactante, ocorrendo assim a associação do metal com as micelas formadas. No caso da surfactina, os metais associados a fases orgânicas podem ser removidos por soluções básicas (MULLIGAN; YONG; GIBBS, 2001). Nitschke e Pastore (2003) efetuam experimentos com biosurfactantes a partir de *Bacillus subtilis* aplicando resíduos agroindustriais, como manipueira, sendo que o composto obtido apresentou capacidade para uso em biorremediação de poluentes e em recuperação de petróleo.

## 5 PRODUÇÃO DE SURFACTINA EM ESCALA DE LABORATÓRIO

Para a produção de surfactina aplicam-se conceitos de bioprocessos que, segundo Pereira Junior; Bon e Ferrara (2008), pode ser definido como um conjunto de operações que efetuam o tratamento da matéria-prima/resíduo, o preparo dos meios, a esterilização (quando necessário) e a transformação do substrato em produto por rota bioquímica, seguida de processos de separação e purificação de produtos (Figura 8) .

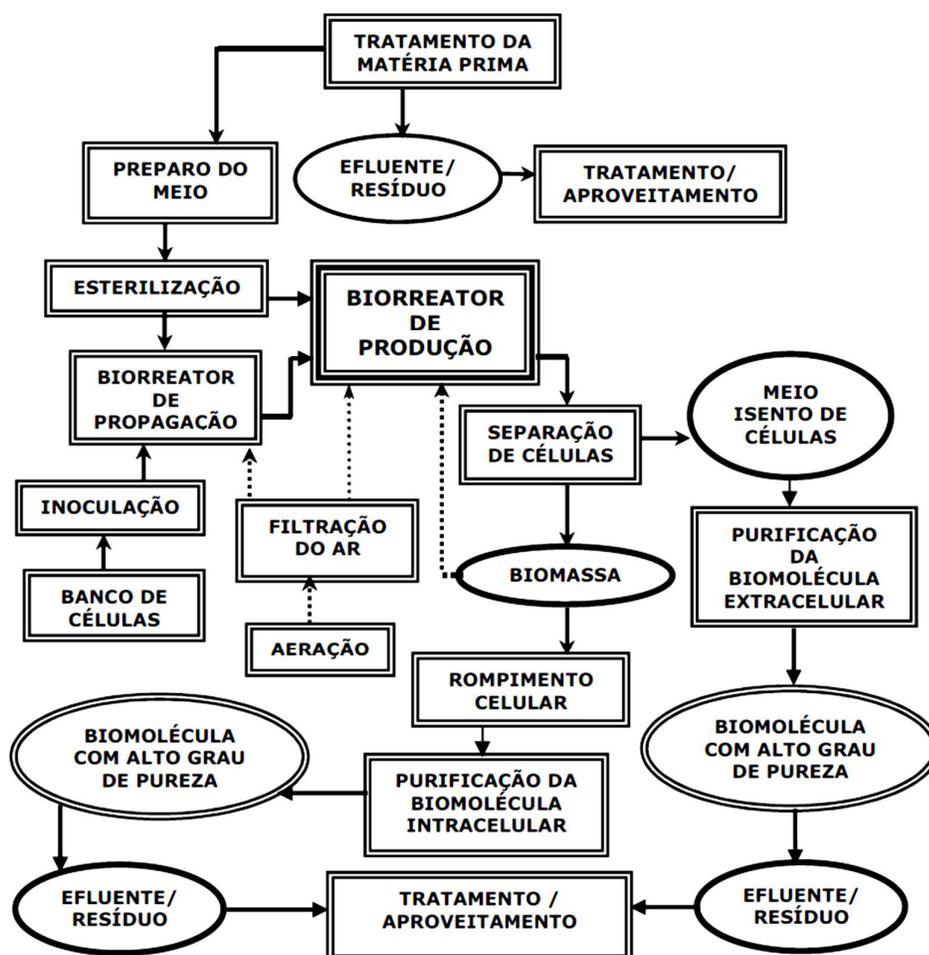


Figura 8 - Esquema simplificado de um típico Bioprocesso.  
Fonte: Pereira Junior; Bon e Ferrara (2008).

Em geral, a produção de biosurfactantes é dependente do metabolismo celular no qual obtemos o metabolito primário, quando o produto está associado ao crescimento do microrganismo e o secundário, quando ocorre a produção na fase

estacionária. Pereira Junior; Bon e Ferrara (2008) citam que algumas transformações microbianas, analogamente às reações químicas, atingem rendimentos próximos ao máximo estequiométrico (produtos do metabolismo primário), embora apresentando taxas globais de produção baixas. Outras, como as do metabolismo secundário, resultam em baixos valores de rendimento e produtividade, havendo um enorme campo para avanços em ambos os casos, sendo que a partir de um melhor entendimento sobre a fisiologia celular e a interação da célula com o meio ambiente no biorreator o êxito de um bioprocessamento é atingido.

De forma geral o elemento central de um processo biotecnológico é o reator (comumente conhecido como fermentador ou dorna), por ser a região na qual ocorrerão as transformações desejadas. Porém, vale destacar a importância de outras duas etapas: os tratamentos iniciais (“Upstream Processes”), responsável por proporcionar as condições ideais para as transformações no reator, e ainda os tratamentos finais (“Downstream Processes”), com a funcionalidade de separação e purificação dos produtos/subprodutos obtidos e o tratamento dos resíduos gerados (BORZANI *et al.*, 2001). Schmidell e Facciotti (2001) denominam, ainda, os reatores químicos nos quais ocorrerão as biotransformações como “biorreatores”, “reatores bioquímicos” e “reatores biológicos”, sendo que serão constituídos de biocatalisadores que variam entre enzimas e células vivas (microbianas, animais e vegetais).

O processamento da surfactina, como pode ser observado em escala de bancada na Figura 9, segue basicamente as mesmas etapas em relação aos outros biosurfactantes extracelulares, sendo a adaptação ao tipo de microrganismo utilizado e às demais operações, muitas vezes variável. Por se tratar de diferentes condições exigidas pelos microrganismos tanto no processo de preparo da cultura e do meio (“Upstream Processes”), na transformação no biorreator e no processo separação e purificação (“Downstream Processes”) ocorre a necessidade de destacar os aspectos gerais, como: características do agente biológico, matérias-primas, preparo do meio, biorreator, separação e purificação de produtos.

Schmidell (2001) destaca que o sucesso fermentativo depende basicamente do microrganismo utilizado, do meio de cultura, a forma de condução do processo e as etapas de recuperação do produto, e declara ainda, que essas etapas se interagem intensamente sendo necessário descrevê-las de forma conjunta e levando em consideração os aspectos biológicos e econômicos.



Figura 9 - Processamento de surfactina desenvolvido com rendimento de 6000 mg/L.

Fonte: Hsieh (2007).

Nota: (1) Tanque de Meio; (2) Motor de Agitação; (3) Reator Principal; (4) Sistema Externo com Cilindros de Carvão Ativado; (5) Coletor de Espuma (6) Tanque de Precipitação Ácida e (7) Bomba Peristáltica.

## 5.2 AGENTE BIOLÓGICO E MEIO DE CULTIVO

A partir desses princípios, definir o agente biológico (microrganismo) que efetuará a biotransformação é primordial. Isso sem dúvida vai além de uma simples escolha, pois esta etapa interferirá em toda a cadeia produtiva. Pereira Junior; Silva Bon e Ferrara (2008) declaram que para selecionar o agente biológico visando uma escala industrial algumas propriedades devem ser levadas em consideração, como: a eficiência na conversão de substrato em produto; estabilidade em condições extremas de pressão osmótica do meio, temperatura e força iônica; ter resistência e tolerância a substâncias tóxicas. Schmidell (2001) destaca ainda, que o agente biológico não deve exigir condições muito complexas visando a economia do

processo, permita elevada concentração de produto no caldo fermentado acumulando-se no meio e que não seja patogênico.

O *Bacillus subtilis* é o agente biológico mais citado e avaliado na produção de lipopeptídios, entre eles a surfactina. Sendo que microrganismos como este, segundo Schmidell (2001), podem ser adquiridos do isolamento a partir de recursos naturais (água, solo, plantas etc.), compra em coleções de culturas, obtenção de mutantes naturais ou induzidos por métodos convencionais e obtenção de microrganismos recombinantes por técnicas de engenharia genética. Nitschke e Pastore (2003) demonstraram a potencialidade da maniveira para uso como substrato alternativo na produção de biosurfatantes por isolados de *Bacillus* e obtiveram um composto com capacidade para uso em biorremediação de poluentes e em recuperação de petróleo; Barros (2007) também conseguiu bons resultados em escala de laboratório utilizando uma linha de *Bacillus subtilis* pertencente à coleção de cultura do Laboratório de Bioaromas da Unicamp; Whang et al. (2008) investigou o potencial de aplicação de surfactina para uma maior biodegradabilidade de água e solo contaminado com óleo diesel com uma série de experiências em escala de bancada produzindo-a, também, a partir de uma linhagem de *Bacillus subtilis* resultando numa redução da tensão superficial de 72 dyn/cm para menos de 30 dyn/cm, com uma concentração micelar crítica (CMC) de 45 mg/L. Hsieh (2007) utilizou a linhagem ATCC 21332 do *Bacillus subtilis* para a produção de surfactina num biorreator em escala piloto que foi adaptado para resolver os problemas da severa formação de espuma. Faria (2010) selecionou microrganismos produtores de biosurfactantes através das técnicas de avaliação da capacidade de emulsificação e medida da tensão superficial no sobrenadante, e dentre 16 outras bactérias isoladas inicialmente de solos contaminados por derivados do petróleo e, posteriormente, depositados na Coleção de Culturas do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana (LSFM) da UNICAMP o *Bacillus sp* foi um dos mais eficientes no estudo.

Outra etapa fundamental para o sucesso no processo fermentativo é definir o meio em que o microrganismo selecionado será cultivado, enriquecendo-o e proporcionando o seu condicionamento para um trabalho eficiente. Diante da importância dessa escolha tanto para o agente biológico quanto para o restante do processo, Schmidell (2001) pontua algumas características desejáveis no meio de cultivo, como por exemplo: baixo custo, porém que supra as necessidades

nutricionais do microrganismo; possa auxiliar no controle do processo como em variações drásticas de pH e formação de espuma; não interferir na recuperação do produto; propiciar tempo de armazenamento para aumentar a disponibilidade; ter uma composição sem muitas variações e que não interfira no tratamento do efluente. Para Pereira Junior; Silva Bon e Ferrara (2008) os meios de propagação e produção, como define o meio de cultivo, deve conter nutrientes balanceados para uma maior eficiência de geração de produto, envolvendo fonte de carbono e de nitrogênio, co-fatores (componentes essenciais para atividade máxima dos sistemas enzimáticos), reagentes específicos para incorporação de determinado grupo estrutural à molécula do produto e elementos traços.

Schmidell (2001) cita a existência de meios sintéticos no qual a composição dos nutrientes é conhecida e destaca também a condição referente a uma produção em escala industrial, que podem ser observadas na Figura 10:

<b>Meio Sintético</b>	<b>Alternativas Aplicadas em Grande Escala</b>
Fonte de Carbono: glicose, sacarose, frutose, amido e celulose.	Uso de matérias-primas naturais ricas em açúcares, nitrogênio, fósforos e sais. São exemplos: caldo de cana, melaço, farinha de trigo, de milho, de soja, de cevada, água de maceração de milho, etc.
Fonte de Nitrogênio: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , aminoácidos ou ureia.	
Fonte de fósforo: fosfatos solúveis (monoamônio fosfato ou diamôniofosfato)	
Elementos traços: Na, K, Ca, Fe, Cu, Mg, Mn, Co etc.	

Figura 10 - Substâncias que constituem o meio sintético e fontes alternativas.

Fonte: Schmidell (2001).

Nota: Adaptado pelo autor

Costa, Nitschke e Contiero (2008) efetuaram a seleção de microrganismos pertencentes ao gênero *Pseudomonas* com capacidade de produzir biossurfactantes a partir de resíduos de óleos e gorduras gerados em restaurantes e indústrias alimentícias. Borra de soja, gordura de frango, gordura vegetal hidrogenada e óleo de soja usados em frituras foram estudados como fonte de carbono. Dentre os resíduos propostos, a borra de soja foi considerada o melhor substrato, gerando  $9,69 \text{ g.L}^{-1}$  de ramnolipídios e uma tensão superficial de  $31 \text{ mN/m}$ . Foi utilizado um meio de cultivo contendo ( $\text{g.L}^{-1}$ ):  $\text{NaNO}_3$ , 4.0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1.0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5;

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.5; KCl, 0.1; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.01; CaCl<sub>2</sub>, 0.01; extrato de levedura, 0.01 e 0.05 mL.L<sup>-1</sup> de uma solução de elementos traços: B(0,026%), Cu (0,05%), Mn (0,05%), Mo (0,06%) e Zn (0,07%), suplementados com 2% (p.v<sup>-1</sup>) de óleo de soja como fonte de carbono. Faria (2010) realizou experimentos visando selecionar um substrato orgânico de baixo custo, de forma a tornar viável a produção e comercialização dos biossurfactantes em larga escala. A produção foi realizada em frascos Erlenmeyers de 250 ml, contendo 50 ml de meio basal constituído de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,5 g.L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 g.L<sup>-1</sup>, NaNO<sub>3</sub> 3.0 g.L<sup>-1</sup>, pH entre 6,8-7,2 e acrescidos de extrato de levedura 0,1 g.L<sup>-1</sup> e tetradecano 5.0% (v/v). Soluções-estoque de vitaminas e elementos traços também foram adicionadas na concentração de 0,1% (v/v), sendo aplicada uma linhagem de *Bacillus subtilis* dentre outros microrganismos. Lima Junior (2012) conduziu experimentos utilizando o micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633 utilizando meio com resíduo de soja (melaço) em diferentes concentrações de açúcares totais e meio formulado com base na composição centesimal do produto e do micro-organismo (Anexo A) a fim de se obter a surfactina. Bezerra (2006) avaliou a influência da concentração de melaço, de nitrato de sódio, velocidade de agitação e razão de aeração na produção de biossurfactantes em cultivo descontínuo submerso visando obter condições de processo ideais para uma ampliação da escala. Foi utilizado como meio de cultivo uma solução tampão de fosfato à 100mM e pH 7,0, adicionou-se 1 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,25 g/L de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 1mL/L de uma solução de estoque de sais, sendo 0,01g/100mL de EDTA, 0,3g/100mL de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,01g/100mL de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,01g/100mL de CaCl<sub>2</sub>, 0,01g/100mL de CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O e 0,01g/100mL de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. *Bacillus subtilis* ATCC 21332, utilizado por Hsieh (2007) em sua pesquisa de otimização na produção de surfactina, foi pré-cultivada a 30°C e 200 rpm em meio Luria-Bertani ( NaCl 10 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g.L<sup>-1</sup>, Triptona 10 g.L<sup>-1</sup>) por 12-14 h, e inoculados (5% de inóculo) em meio fresco MSI (Iron-enriched minimal salt médium) com a composição: Glucose 40 g.L<sup>-1</sup>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 50 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 30 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30 mM, CaCl<sub>2</sub> 7 µM, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 800 µM, Sodium EDTA 4 µM, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 2.0mM.

Uma possível formulação do meio basal pode ser adquirida levando em consideração a composição elementar das células. Segundo Pereira Junior; Bon e Ferrara (2008), para que um processo de reprodução celular seja possível, três parâmetros devem ser atingidos, são eles: informação de reprodução, contida no

material genético do microrganismo; matéria prima, disponibilizada através do meio de cultivo e energia, obtida através do catabolismo da fonte de carbono (substrato). Sendo que carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio correspondem juntos, a cerca de 90 a 92% do total da massa celular, esta que em típicas composições pode ser observada na Figura 11:

<b>ELEMENTOS</b>	<b>BACTÉRIA</b>	<b>LEVEDURA</b>	<b>BOLORES</b>
Carbono	46-52	46-52	45-55
Hidrogênio	8-12	8-12	8-12
Oxigênio	18-24	18-24	18-24
Nitrogênio	10-14	5-9	3-7
Magnésio	0,1-0,5	0,1-0,5	0,1-0,3
Fósforo	2,0-3,0	0,8-2,5	0,4-4,5
Enxofre	0,1-1,0	0,01-0,25	0,1-0,5
Cálcio	0,01-1,0	0,1-0,3	0,1-1,4
Potássio	1,0-4,5	1,0-4,0	0,2-2,5
Ferro	0,02-0,2	0,01-0,5	0,1-0,2
Outros	<0,01	<0,01	<0,01
<b>COMPOSTOS</b>			
Proteínas	50-60	35-45	25-40
Carboidratos	6-15	30-45	40-55
Lipídios	5-10	5-10	5-10
Ác. Nucléicos	15-25	5-15	2-10
Cinzas	4-10	4-10	4-10

Figura 11 - Composição centesimal de células microbianas.

Fonte: Bailey e Ollis (1986 apud PEREIRA JUNIOR; BON; FERRARA, 2008).

Assim, levando em consideração os componentes mais importantes, Pereira Junior, Bon e Ferrara (2008) chegaram a seguinte equação estequiométrica (Figura 12), para uma estimativa de necessidades nutricionais que o microrganismo apresentará:

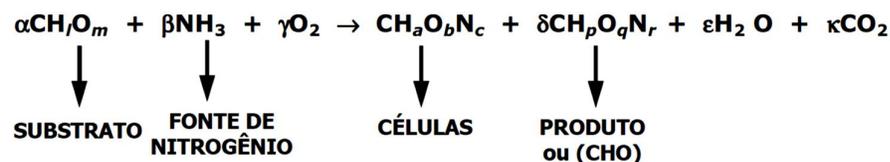


Figura 12 - Equação estequiométrica envolvendo estruturas moleculares de substrato, fonte de nitrogênio, oxigênio, produto e subprodutos.

Fonte: Pereira Junior, Bon e Ferrara (2009)

### 5.3 CINÉTICA DO PROCESSO

Vários fenômenos químicos, físicos e, naturalmente, biológicos ocorrem num biorreator, tornando o desenvolvimento de um bioprocesso tanto complexo quanto fascinante. Este projeto envolve vários aspectos, entre eles: a cinética do bioprocesso, o cálculo das tubulações e equipamentos necessários para manutenção de esterilidade, as características hidrodinâmicas do meio reacional, a transferência de massa de nutrientes na célula, a transferência de massa de oxigênio da fase gasosa para o seio do líquido e, posteriormente, para as células (em processos aerados), a transferência de massa de produtos e subprodutos das vizinhanças das células para o seio do meio de cultivo, a transferência de calor metabólico e o controle da fisiologia microbiana (Pereira Junior; Silva Bon e Ferrara, 2008).

Desta forma, é possível notar a grande importância em estudar a cinética aplicada nos processos fermentativos, sendo esta, paralelamente à estequiometria, um dos aspectos que descreve a evolução do agente biológico, no qual, como indica Hiss (2001), esse estudo consiste inicialmente no acompanhamento dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, como o microrganismo (biomassa), os produtos (metabólitos) e os nutrientes (substratos no meio de cultura), todos em função do tempo de fermentação.

Alterthumm (2001) ressalta, ainda, que de modo geral o que se mede é o crescimento de uma população microbiana integralmente e não o crescimento individual e pode ser definida de várias formas, entre elas: determinação de peso seco ou úmido, através de centrifugação; determinação química de componentes celulares, pela dosagem de alguns componentes celulares como proteína e ácidos nucleicos e a turbidimetria, através da leitura da absorvância ou capacidade de dispersão de luz.

Para que possam ser geradas informações com os quais, posteriormente, sejam utilizadas para a otimização do processo é necessário conhecer, assim como propõe Bezerra (2006), os valores intermediários que irão permitir a definição dos perfis das curvas ou suas formas matemáticas para uma análise adequada. Segundo Hiss (2001), esses perfis representam o ponto de partida para uma descrição quantitativa, como por exemplo, a duração do processo. E possibilita ainda, através de variáveis como velocidade de transformação e fatores de

conversão, uma comparação quantitativa entre diferentes condições de cultivo, como: pH, temperatura, etc.

### 5.3.1 Velocidades instantâneas de transformação

As velocidades instantâneas de crescimento ou reprodução dos agentes ativos, juntamente com o consumo de substrato e formação de produto, como Hiss (2001) são, sem sombra de dúvidas, os mais importantes parâmetros necessários para o dimensionamento de uma instalação produtiva, viabilizando a transposição de um experimento de laboratório para uma escala industrial. E podem ser matematicamente moduladas, como na Figura 13:

a)	$r_X = \frac{dX}{dT}$
b)	$r_S = -\frac{dS}{dT}$
c)	$r_P = \frac{dP}{dT}$

Figura 13 - Equações relacionando velocidades instantâneas.

Fonte: (Hiss, 2001)

Nota: Adaptado pelo autor. Sendo: (a) Taxa de Crescimento ou Reprodução do Microrganismo, (b) Taxa de Consumo de Substrato e (c) Taxa de Formação de Produto em função do tempo.

De forma gráfica elas são ilustradas a seguir (Figura 14). Podem ser modeladas também, equações de interesse prático na avaliação do desempenho de um processo fermentativo (Figura 15).

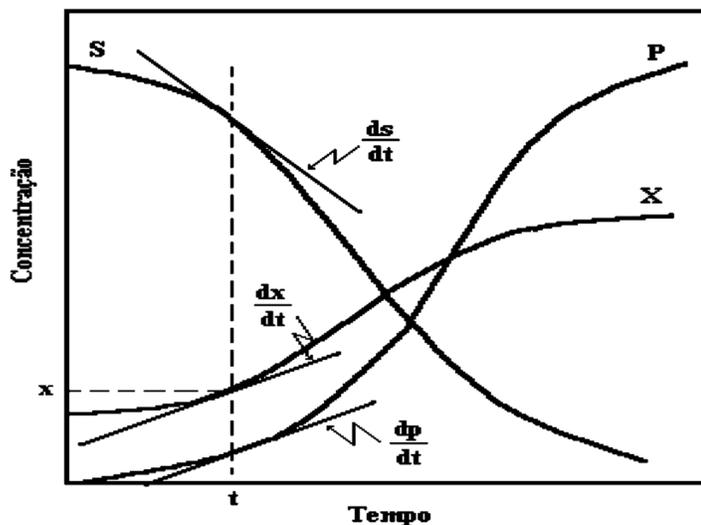


Figura 14 - Representação das variações de concentrações em um processo fermentativo no tempo  $t$ .

Fonte: (Bozani; Lima; Aquarone, 1975, Bezerra, 2006)

Notas: P, concentração do produto; S, substrato e X, microrganismo.

d) $P_X = \frac{X_m - X_0}{t_f}$
e) $P_P = \frac{P_m - P_0}{t_{fP}}$

Figura 15 - Expressões relacionando produtividade em biomassa (d) e a produtividade de produto (e).

Fonte: (Hiss, 2001)

Notas: Adaptada pelo autor. Onde:  $P_X$  = produtividade em biomassa ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ),  $X_m$  = concentração de biomassa seca ( $\text{g.L}^{-1}$ ) no tempo  $t$  de cultivo,  $X_0$  = concentração de biomassa seca ( $\text{g.L}^{-1}$ ) no início do cultivo e  $t_f$  = tempo de cultivo (h).  $P_P$  = produtividade em produto ( $\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ),  $P_m$  = concentração volumétrica de surfactina ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) no tempo  $t$  de cultivo,  $P_0$  = concentração volumétrica de surfactina ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) no início do cultivo e  $t_{fP}$  = tempo de cultivo (h).

Pelo fato de o crescimento do microrganismo ser de natureza autocatalítica, Bezerra (2006) ressalta a lógica em supor que a concentração de microrganismo  $X$  influi na velocidade à medida que aumenta a população, em consequência aumenta-se o consumo de substrato e a formação de produto, sendo possível deduzir que  $r_X = \mu X$ ,  $r_S = \mu S$  e  $r_P = \mu P$ . Chegando-se assim às equações denominadas velocidades específicas de crescimento, consumo de substrato e de formação de produto, como na Figura 16:

f) $\mu_x = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$
g) $\mu_s = \frac{1}{X} \cdot \left( -\frac{dS}{dt} \right)$
h) $\mu_p = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt}$

Figura 16 - Equações denominadas velocidades específicas de crescimento (f), consumo de substrato (g) e de formação de produto (h).

Fonte: (Hiss, 2001)

Nota: Adaptada pelo autor

De acordo com a Figura 14, ao levarmos em conta um tempo  $t$  no processo de fermentação, segundo Hiss (2001), podemos relacionar os valores da concentração do produto ( $P$ ), substrato ( $S$ ) e microrganismo ( $X$ ) através de fatores de conversão. Assim, apesar de um grande número de fatores influenciar no rendimento do microrganismo (incluindo composição do meio, a natureza das fontes de carbono e nitrogênio, pH e temperatura), de modo geral para conhecer os valores dos rendimentos que, basicamente, são obtidos através do estudo do crescimento microbiano e da produção de metabólitos, se relacionarmos produto obtido e o substrato consumido, como pontuado por Bezerra (2006), temos o rendimento celular formulado como na figura 17:

$$h) Y_{X/S} = -\frac{dX}{dS} = (X_t - X_0) \cdot (S_0 - S)^{-1}$$

Figura 17 - Equação do fator de conversão de substrato em biomassa.

Fonte: (Hiss, 2001)

Notas: Adaptada pelo autor. Onde:  $Y_{X/S}$  = fator de conversão de substrato em biomassa (grama de biomassa seca obtida por grama de substrato total consumido),  $X_t$  = concentração de biomassa seca ( $g \cdot L^{-1}$ ) no tempo  $t$  de cultivo,  $X_0$  = concentração de biomassa seca ( $g \cdot L^{-1}$ ) no início do cultivo  $S_0$  = concentração do substrato ( $g \cdot L^{-1}$ ) no início do cultivo e  $S$  = concentração do substrato ( $g \cdot L^{-1}$ ) no tempo  $t$  de cultivo.

e quando a relação for entre a massa de produto formada e a de substrato consumido ( Figura 18):

$$i) \quad Y_{P/S} = -\frac{dP}{dS} = (P_t - P_0) \cdot t_f^{-1}$$

Figura 18 - Equação do fator de conversão de substrato em produto.

Fonte: (Hiss, 2001)

Notas: Adaptada pelo autor. Onde:  $Y_{P/S}$  = fator de conversão de substrato em surfactina (miligrama de surfactina obtida por grama de substrato total consumido),  $P_t$  = concentração de surfactina ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) no tempo  $t$  de cultivo,  $P_0$  = concentração de surfactina ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) no início do cultivo,  $S_0$  = concentração do substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ ) no início do cultivo e  $S$  = concentração do substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ ) no tempo  $t$  de cultivo. A concentração do produto no início do cultivo ( $P_0$ ) é geralmente desprezível.

Baseando-se nesses princípios, Costa; Nitschke e Contiero (2009), objetivando selecionar bactérias com potencial para a produção de biosurfactante utilizando 4 culturas, entre elas *Bacillus subtilis*, avaliaram os parâmetros cinéticos velocidade instantânea máxima de crescimento celular e de formação de produto, através das equações a e c da Figura 13, a produtividade em produto, através da equação e da Figura 15 e ainda o tempo de geração durante o cultivo com a seguinte :

$$j) \quad tg = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}}$$

Figura 19 - Equação do fator de conversão de substrato em produto.

Fonte: (Hiss, 2001)

Notas: Adaptada pelo autor. Onde:  $tg$ , tempo de geração celular.

Obtêm-se os parâmetros cinéticos na Figura 20:

Parâmetro cinético	Cultura			
	1	2	3	4
$X_{\text{máx}}$ ( $\text{g}_{\text{cél}} \text{L}^{-1}$ )	1,98	0,48	1,23	0,96
$r_X$ ( $\text{g}_{\text{cél}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	0,042	0,003	0,026	0,007
$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,043	0,010	0,037	0,063
tg (h)	16,1	69,3	18,7	11,0
$r_P - \text{TS}_{\text{pre cél}}$ ( $\text{mN m}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	1,36	0,45	0,35	0,21
$r_P - \text{TS}_{\text{aus cél}}$ ( $\text{mN m}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	1,10	0,39	0,30	0,37
$r_P - \text{AE}_{\text{o/a}}$ ( $\text{UE h}^{-1}$ )	4,45	4,15	3,40	5,93
$r_P - \text{AE}_{\text{a/o}}$ ( $\text{UE h}^{-1}$ )	0,80	0,71	0,39	0,83
$P_P - \text{TS}_{\text{pre cél}}$ ( $\text{mN m}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	2,01	0,31	0,24	0,12
$P_P - \text{TS}_{\text{aus cél}}$ ( $\text{mN m}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	1,89	0,73	0,30	0,49
$P_P - \text{AE}_{\text{o/a}}$ ( $\text{UE h}^{-1}$ )	2,65	2,19	1,11	2,40
$P_P - \text{AE}_{\text{a/o}}$ ( $\text{UE h}^{-1}$ )	0,40	0,33	0,25	0,38

Figura 20 - Parâmetros cinéticos determinados para variadas culturas.

Fonte: (Costa; Nitschke e Contiero, 2009)

Notas: Onde: Culturas pura de *Corynebacterium Aquaticum* (Cultura 1), Mista de *Corynebacterium Aquaticum* e *Bacillus sp.* (Cultura 2), Mista de *Corynebacterium sp.*, *Bacillus cereus* e *Bacillus mycoides* (Cultura 3) e pura de *Bacillus subtilis* (Cultura 4).  $X_{\text{máx}}$  = concentração celular máxima;  $r_X$  = velocidade instantânea máxima de crescimento celular;  $\mu_{\text{máx}}$  = velocidade específica máxima de crescimento celular; tg = tempo de geração;  $r_P$  = velocidade instantânea máxima de formação de produto;  $P_P$  = produtividade máxima em produto;  $\text{TS}_{\text{pre cél}}$  = tensão superficial do meio fermentado na presença das células de micro-organismo;  $\text{TS}_{\text{aus cél}}$  = tensão superficial do meio fermentado na ausência das células de micro-organismo;  $\text{AE}_{\text{o/a}}$  = atividade emulsificante óleo em água;  $\text{AE}_{\text{a/o}}$  = atividade emulsificante água em óleo.

A partir da Figura 20 é possível observar que dentre as 4 culturas a de *Bacillus subtilis* (4) foi a que apresentou maior velocidade específica de crescimento celular,  $0,063 \text{ h}^{-1}$ , como também uma velocidade instantânea de crescimento de  $0,007 \text{g}_{\text{cél}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$  e, ainda, uma das culturas com maior atividade emulsificante óleo em água e água em óleo ( $2,40$  e  $0,38 \text{ UE h}^{-1}$ ) velocidade instantânea de formação de produto. Sendo ainda, a cultura que proporcionou maior velocidade instantânea de formação de produto relacionados a formação às atividades emulsificantes óleo em água ( $5,93 \text{ EU h}^{-1}$ ) e água em óleo ( $0,83 \text{ UE h}^{-1}$ ).

Faria (2010) através da linhagem *Bacillus sp.* em seu estudo para tornar viável a produção em larga escala aplicando glicerina residual bruta como substrato orgânico, produziu surfactina e avaliou a produção por meio da medida da tensão superficial em tensiômetro por meio da técnica do Anel de Du Nouy, pelo estudo da atividade de emulsificação e a determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC). Utilizando fermentador de 1 litro o número de células viáveis no inóculo foi avaliado pelo método de diluição seriada, onde alíquotas de 100 mL de cada uma das diluições foram plaqueadas por *spread plate* em placas contendo Agar Nutriente (NA), que foram incubadas a 30°C por 24 horas. As colônias foram contadas para se obter as unidades formadoras de colônia (UFC/mL) presentes no inóculo, chegando-se a  $9,0 \times 10^5$  UFC/mL e obteve os dados da Figura 21:



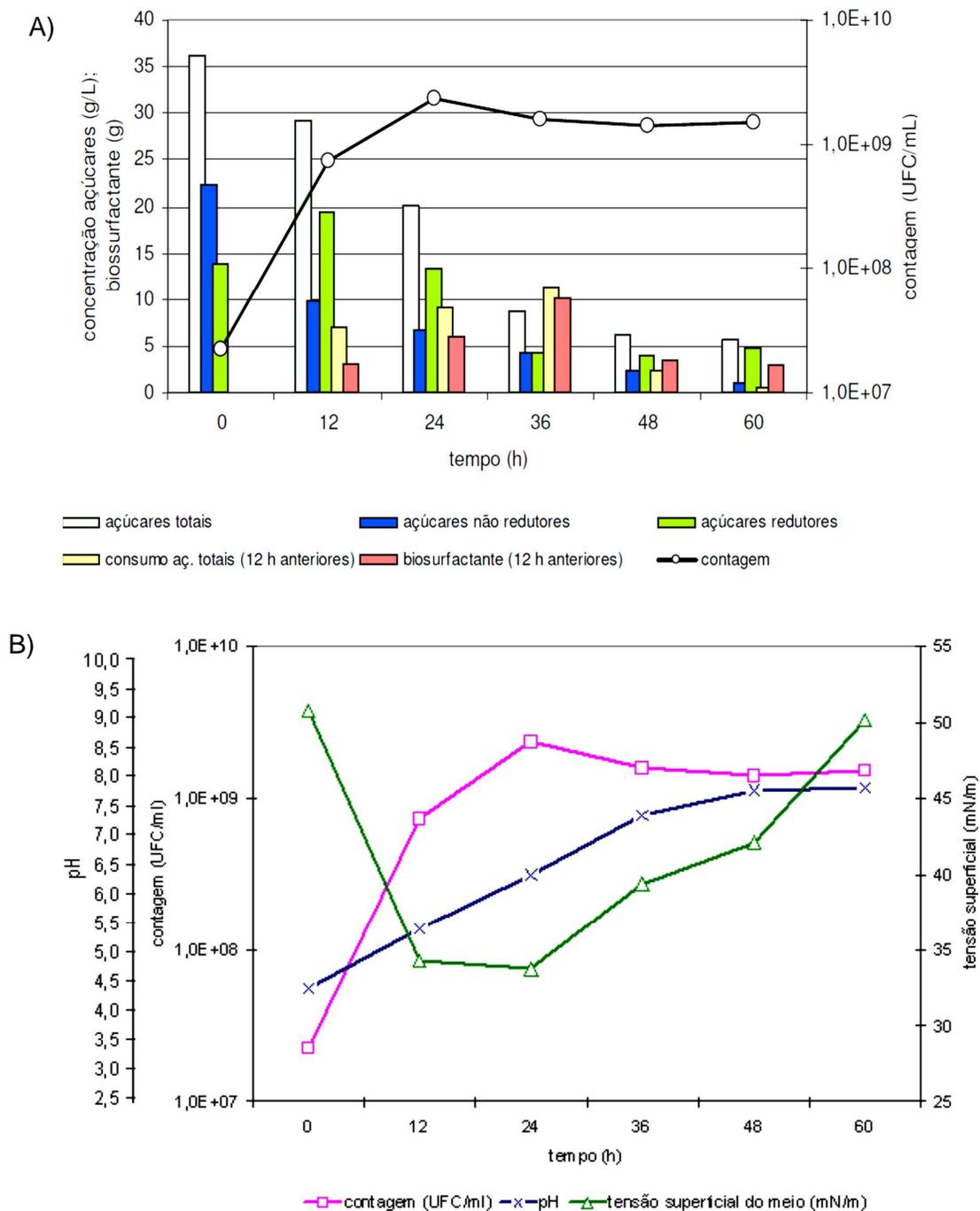
Figura 21 - Fermentações realizadas em diferentes rotações utilizando fermentador com cubas com volume útil de 1L e suas respectivas avaliações.

Fonte: (Faria, 2011)

Notas: Adaptada pelo autor

Em seu projeto de desenvolvimento de um biorreator inovador Hsieh (2007) chegou a uma alta produção de surfactina. Através da eq. i (Figura 18), que é a relação entre a massa de produto formada e substrato consumido (no caso glicose), chegou-se ao rendimento de  $Y_{p/S} = 0,15 \text{ gg}^{-1}$ , obteve também uma taxa volumétrica de produção ( $r_p$ ) de  $0,1053 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e uma produção máxima ( $P_{m\acute{a}x(p)}$ ) de  $5974 \text{ mgL}^{-1}$ . Barros (2007) objetivando a produção em escala piloto de

biossurfactante a partir de *Bacillus subtilis* LB5a aplicando manipueira como substrato elaborou o estudo dos parâmetros cinéticos relacionados à produção em função da concentração de açúcares totais e redutores, do pH, da contagem de UFC viáveis, da tensão superficial do meio de cultura, do volume de espuma liquefeita produzida, da produção de biossurfactante semipurificado e da concentração de surfactante por litro de espuma liquefeita, como pode ser observado na Figura 22:



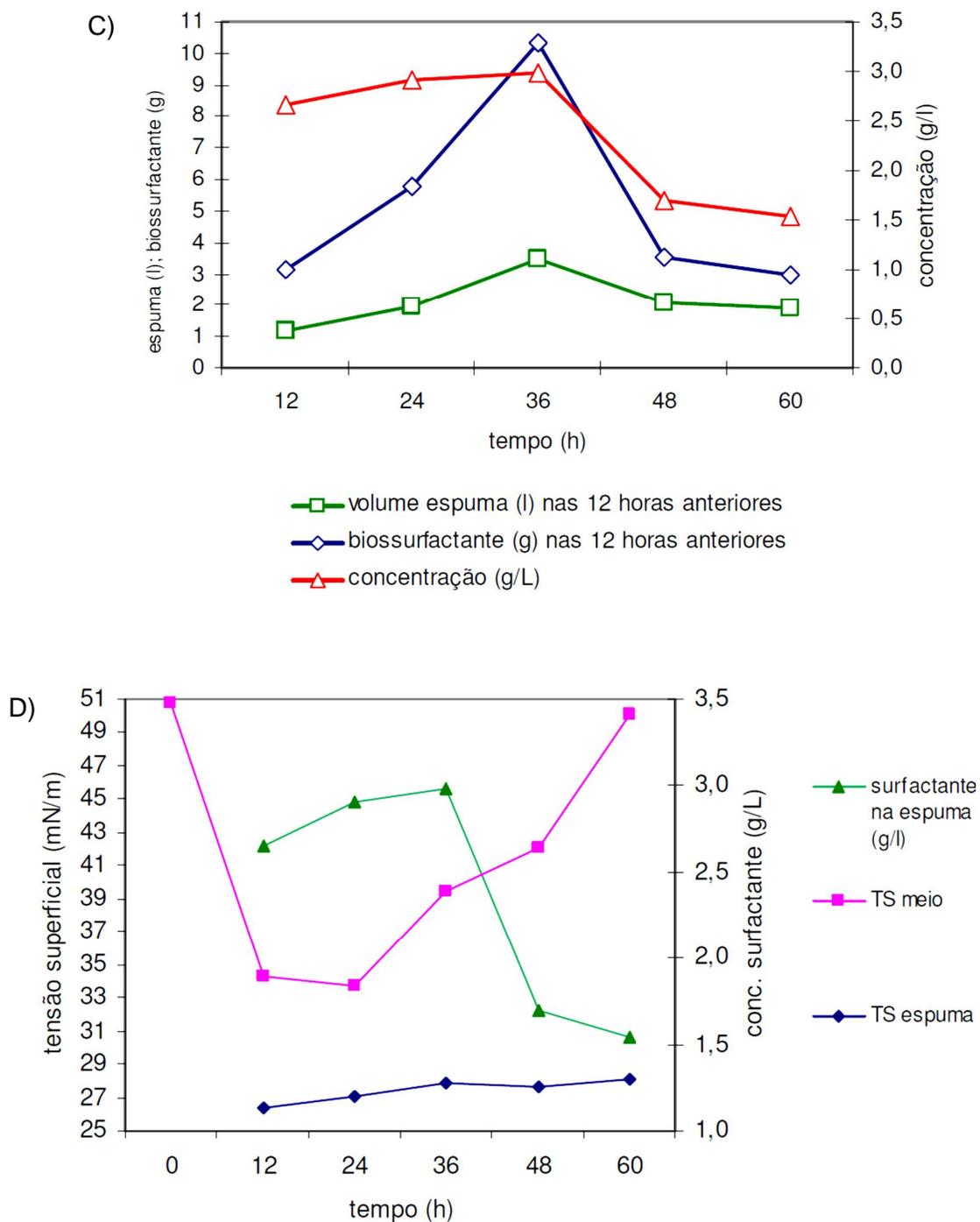


Figura 22 - Cinética do Processo.

Fonte: (Barros, 2007)

Notas: sendo (A), Cinética de produção de biossurfactantes e consumo de açúcares por *Bacillus subtilis* LB5a em manipueira; (B), Cinética de crescimento da cultura de *Bacillus subtilis* LB5a em manipueira; (C), Cinética da produção de biossurfactante de *Bacillus subtilis* LB5a em manipueira e (D), Relação entre as medidas de tensão superficial do meio de cultura e da espuma coletada.

### 5.3.2 Curvas de crescimento

Além desses parâmetros, obter uma definição linear do crescimento do agente biológico é de grande importância para que possa ser acompanhado o seu desenvolvimento e aumentar a sua eficiência no biorreator sob o efeito de temperatura controlada e agitação adequada. Segundo Bezerra (2006), pode-se elaborar uma curva de crescimento que pode ser dividida em diferentes fases: Lag, exponencial, estacionária e de declínio (morte). Podendo ser visualizada abaixo:

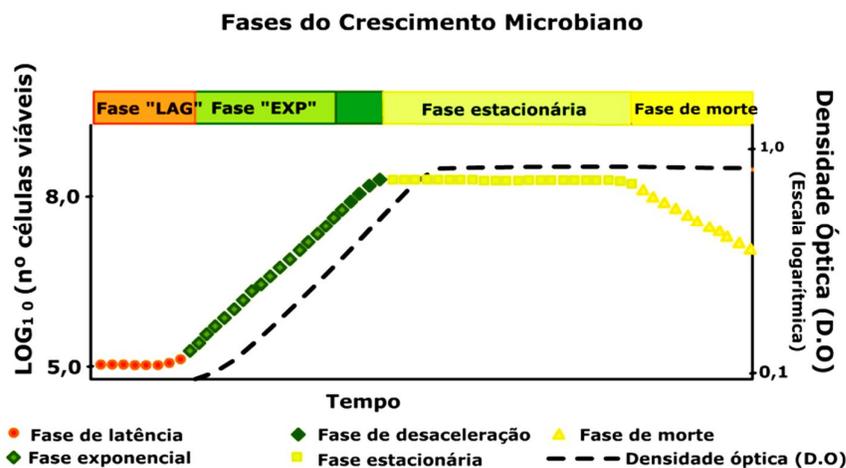


Figura 23 - Fases do crescimento microbiano.  
Fonte: Grupo de Ciências Biológicas do IST (2005).

Complementando, Hiss (2001) indica a existência de 7 fases,

*Fase "lag" ou de latência:* definido como um período de adaptação, no qual a célula sintetiza as enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes do meio de cultivo, ocorrendo após a inoculação do meio com o agente biológico. Neste período não há reprodução de células, podendo adotar  $X = X_0 = constante$  e sua duração pode variar levando em consideração a concentração de inóculo, o tempo de pré-cultivo do agente biológico e o seu estado fisiológico;

*Fase de transição:* quando é possível observar a reprodução microbiana aumentando-se a velocidade de reprodução, eq. a (Figura 13), e a velocidade específica de crescimento, eq. e (Figura 15);

*Fase logarítmica ou exponencial:* na qual a velocidade específica ( $\mu_x$ ) é constante e máxima. A partir desses princípios e rearranjando a eq. f (Figura 16) é possível notar que a velocidade de crescimento é diretamente proporcional à

concentração  $X$  ( $\frac{dX}{dt} = \mu_x \cdot X$ ). Como também, é nessa fase que se caracteriza o tempo de geração ( $t_g$ ) pela eq. k ( $\frac{\ln 2 \cdot X_n}{X_n} = \mu_m \cdot t_g$ ), valendo lembrar que esse tempo é relativamente curto variando entre 15 e 20 min para algumas bactérias;

*Fase linear de crescimento:* na qual a velocidade reprodução ( $r_x$ ) é consideravelmente constante sendo possível visualizar através da eq. l, ( $X = X_n + r_k \cdot (t-t_n) = r_k \cdot t + X_n - r_k \cdot t_c$ );

*Fase de desaceleração:* momento em que se reduz tanto a velocidade de crescimento ( $r_x$ ) quanto a específica ( $\mu_x$ ), aumentando-se ainda o tempo de geração;

*Fase estacionária:* em que  $X$  atinge o valor máximo e constante, ocorrendo um balanço entre a velocidade de crescimento ( $r_x$ ) e a velocidade de morte do microrganismo. Essa redução, segundo Alterthumm (2001), podem ser causadas pelo acúmulo de metabólitos tóxicos, pelo esgotamento de nutrientes e o esgotamento de  $O_2$ ;

*Fase de declínio ou lise:* na qual o valor da concentração celular diminui, drasticamente, numa velocidade que excede a velocidade de produção de novas células, ocorrendo a chamada lise celular (autólise ou rompimento do agente biológico causado pela ação de enzimas intracelulares).

Georgiou, Lin e Sharma (1992 apud MATSUURA, 2004) ressaltam que a maioria dos biossurfactantes são liberados no meio de cultura na fase exponencial de crescimento dos microrganismos, sendo que algumas vezes biossurfactantes são produzidos durante uma parte do ciclo de crescimento e então desativado ou incorporado em outro metabólito. Isso é observado quando *Bacillus licheniformes* crescem em meio mínimo. O máximo do acúmulo do agente ativo ocorre na metade da fase exponencial e subsequentemente decresce rapidamente, provavelmente porque é convertido em um metabólito sem atividade surfactante. No seu estudo de produção da surfactina em fermentações conduzidas por fermentadores de bancada de 1L em três rotações diferentes, Faria (2010) obteve o pico de maior rendimento de biossurfactantes e coleta de espuma em 48 horas após o início da fermentação e um crescimento microbiano máximo em 48 horas mantendo-se constante após 72 horas, caracterizando fase estacionária até 168 horas. Sendo que produção de biossurfactantes ocorreu, preferencialmente, durante a fase exponencial de crescimento e depois decresceu a partir do momento em que as taxas de

crescimento foram se estabilizando. Lima Junior (2012) avaliou a formação de surfactina cultivando linhagens de *Bacillus subtilis* em meio mineral, mineral modificado, meio com melaço de soja e meio formulado. Observando no meio mineral entre os tempos de 24 horas e 36 horas, que a produção surfactina acompanhou o crescimento exponencial do micro-organismo, comportando-se como metabólito primário, no meio mineral modificado nas primeiras 12 horas, ocorreu formação exclusiva de biomassa e posteriormente iniciou-se da formação do produto o qual acompanhou o crescimento exponencial do *Bacillus subtilis*, se estendendo até o tempo de 36 horas, momento em que se obteve a maior produção, aproximadamente  $131 \text{ mg.L}^{-1}$ , e maior fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), cerca de 5,04%. Para o meio formulado a produção de surfactina chegou a, aproximadamente,  $28 \text{ mg.L}^{-1}$  em 24 h acompanhando o crescimento exponencial e a concentração de surfactina atingiu o fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) em 96 horas, cerca de 3,92 %.

#### 5.4 VARIÁVEIS DO PROCESSO

Após a etapa em que foram efetuados os tratamentos iniciais (“Upstream Processes”) no agente biológico, nos quais proporcionaram as condições ideais para as transformações, a mistura é então transferida para o biorreator. Neste, segundo Pereira Junior; Bon e Ferrara. (2008), deverão ser mantidas as condições ótimas para que o microrganismo aplique o máximo de sua atividade catalítica, pelo metabolismo da célula ou uma simples reação enzimática. Estão envolvidas nessas condições ótimas: pH, temperatura, oxigenação e velocidade de agitação.

##### 5.4.1 pH e temperatura

Quanto ao pH, segundo Bezerra (2006), os microrganismos podem crescer em uma faixa de pH que varia de 2,0 para os acidófilos até pH 11,0 para os alcalófilos, sendo necessário conhecer os limites do microrganismo utilizado para uma operação otimizada. Os fungos têm pH ótimo em torno de 5,0, enquanto as bactérias têm pH ótimo por volta de 7,0. Geralmente, alguns microrganismos modificam o pH do meio de cultivo durante seu crescimento, tornando necessária a

inclusão de soluções tampão a fim de garantir que o pH mantenha-se dentro dos limites ótimos para crescimento e formação do produto esperado.

Com relação à temperatura de crescimento os microrganismos podem ser classificados em quatro classes: os psicotrófilos com temperatura que varia de -10 a 15 °C, os mesófilos com temperatura entre 10 e 50 °C e os termófilos com temperatura entre 40 e 70°C e termófilos extremos entre 68 e 110 °C (PELCZAR *et al.*, 2005 apud BEZERRA, 2006).

#### **5.4.2 Oxigenação**

A oxigenação para os microrganismos aeróbicos é de grande importância, como também o controle do fluxo, sendo indispensável ou até mesmo facultativo para aqueles que podem crescer na ausência de oxigênio. Este controle favorece maior rendimento da cultura no processo (SCHMIDELL, 2001).

Segundo Pereira Junior; Bon e Ferrara (2008) essa etapa está intrinsecamente ligada ao metabolismo da célula ou ainda ao direcionamento que se impõe a este, de modo a se obter o produto desejado. Nos processos aerados ocorre a absorção de oxigênio livre podendo ser realizada com aeração natural ou forçada. Nas células de metabolismo aeróbio, o oxigênio proporcionará a produção de ATP, que é a principal fonte de energia nas células, sendo que ele é pouco solúvel em água com um valor da sua concentração de saturação na ordem de alguns miligramas por litro. Devendo assim, ser continuamente suprido ao biorreator.

Dentre diversas formas de fornecimento de oxigênio, Schmidell (2001), levando em consideração a importância desta operação, indicou algumas possibilidades para efetuar a transferência de oxigênio em biorreatores:

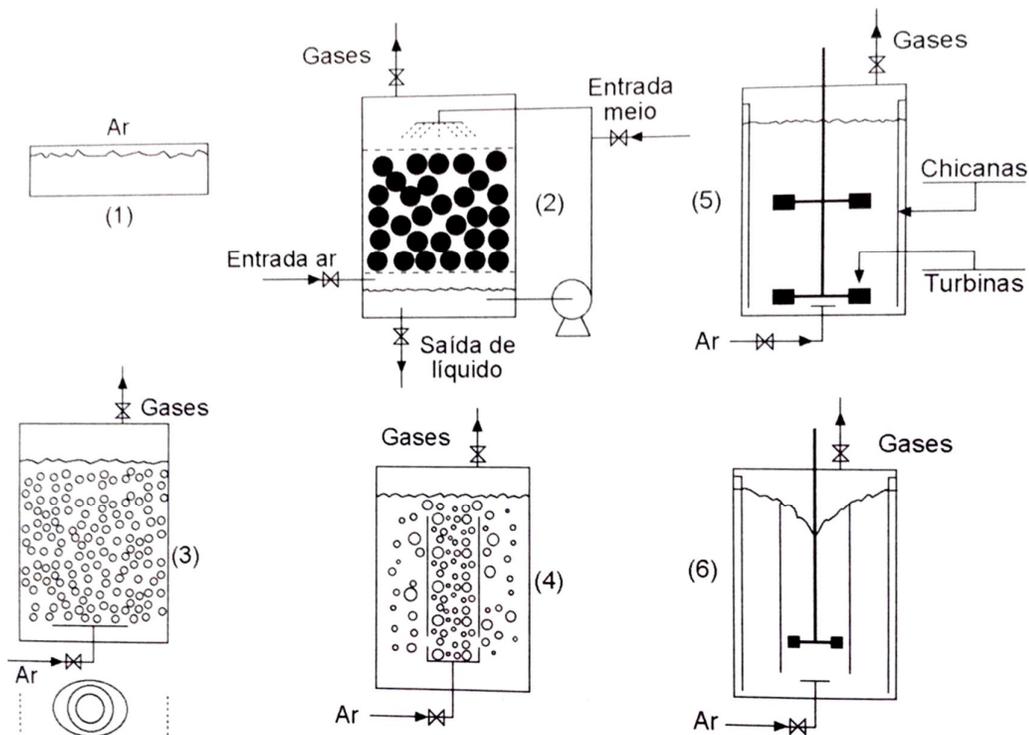


Figura 24 - Sistemas diversos para transferência de oxigênio em biorreatores.

Fonte: Schmidell (2001).

Notas: sendo (1) bandeja ou lagoa; (2) reator de leito fixo; (3) coluna de bolhas; (4) "air-lift"; (5) tanque agitado e aerado; (6) "draught-tube".

Geralmente, como cita Pereira Junior, Bon e Ferrara (2008), no processo com aeração forçada o ar atmosférico esterilizado é borbulhado no seio do meio, onde se dissolve parte do oxigênio que é utilizado pelo agente da transformação. Sendo de ampla aplicação os processos submersos, que por permitir rapidez na solubilização do oxigênio no meio, torna-o mais facilmente utilizável. Porém, também se emprega oxigênio puro ou misturado ao ar, visando melhorias na transferência de massa da fase gasosa para a líquida e melhoria no desempenho do Bioprocessos.

Na busca de determinar uma taxa ótima de transferência de massa ou taxa de absorção de oxigênio da fase gasosa para a líquida, segundo Pereira Junior, Bon e Ferrara (2008), deve-se focar nos aspectos de suprimento e a demanda de oxigênio. Sendo que em um meio em fermentação, a taxa com que o oxigênio se dissolve é dada pela diferença entre o que se fornece e o que é efetivamente utilizado pelas células e o suprimento está relacionado às variáveis de ordem física, tais como: vazão de ar, velocidade de agitação, grau de mistura, temperatura, geometria do

biorreator etc, sendo estudado pelas teorias clássicas de transferência de massa gás-líquido. Já a demanda está ligada à fisiologia da célula e diz respeito à quantidade de oxigênio dissolvido necessária ao cultivo sendo, portanto, proporcional à massa de células. Define-se, assim, como demanda a quantidade de oxigênio necessária por unidade de tempo e por unidade de volume de meio de cultivo ou em fermentação.

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a (C_S - C_L) - q_{O_2} X$$

Figura 25 - Equação para o balanço de oxigênio para um biorreator em operação.

Fonte: (Bailey & Ollis, 1986 apud Pereira Junior; Bon e Ferrara, 2008)

Notas: sendo  $dC_L/dt$ , taxa de transferência de  $O_2$  ou taxa de absorção de  $O_2$  (mols de  $O_2/m^3.h$ );  $K_L$ , coeficiente global de transferência de massa de  $O_2$  na fase líquida (m/h);  $a$ , área específica da superfície de interface ( $m^{-1}$ );  $C_S$ , concentração de saturação de  $O_2$  dissolvido (mols/ $m^3$ );  $C_L$ , concentração de  $O_2$  dissolvido no seio do meio em fermentação (mols/ $m^3$ );  $q_{O_2}$ , demanda específica de oxigênio (mols de  $O_2/g$  células.h) e  $X$ , concentração de células no meio em fermentação ( $g/m^3$ )

### 5.4.3 Agitação

Em qualquer processo que envolva uma mistura, a homogeneização da mesma torna-se necessário para que seja atingido um melhor rendimento, sendo imprescindível um dispositivo que proporcionará a agitação do sistema. Uma das importâncias da agitação, para Bezerra (2006) é proporcionar melhor aeração do meio, favorecendo o crescimento do agente biológico e auxiliar na dispersão dos nutrientes e em sua homogeneização, favorecendo o crescimento dos microrganismos. Ainda, segundo (Schmidell, 2001), este é um parâmetro importante para a otimização da produção de biossurfactantes a partir de microrganismos aeróbios, pois um aumento na velocidade de agitação pode diminuir a produção de biossurfactante devido ao efeito de cisalhamento na parede celular, influenciando na cinética de crescimento do microrganismo, ou pode aumentar a produção, junto com a aeração, devido ao aumento da taxa de transferência de oxigênio.

Faria (2010) efetuou fermentações em batelada simples em fermentador de bancada de 1,5 litros (Figura 21) e de 10 litros (Figura 26), em que as fermentações foram conduzidas em três diferentes rotações (150, 250 e 350  $rev.min^{-1}$ ), com o objetivo de estabelecer a melhor rotação de trabalho para a produção de

biossurfactantes por *Bacillus subtilis* em meio de cultura contendo glicerina residual bruta como única fonte de carbono. As fermentações foram iniciadas com 850 ml de meio basal adicionado de glicerina residual na concentração de 5% (v/v), sendo iniciadas, em média, com um meio contendo  $9,0 \times 10^5$  UFC/mL. As fermentações foram conduzidas a temperatura de 32°C, aeração de 0,5 (vvm) ar/litro e pH inicial e final entre 6,8 – 7,2.



Figura 26 - Fermentação de 10 litros realizada em fermentador contendo meio de cultivo adicionado de glicerina residual como única fonte de carbono.

Fonte: (Faria, 2010)

Em seu estudo no desenvolvimento em escala de bancada de um biorreator economicamente viável (Figura 9), Hsieh (2007) incubou uma cultura de *B. subtilis* ATCC 21332 a 30°C com 300 rpm de agitação, posteriormente transferiu 100 ml da cultura para o fermentador modificado contendo 2L de meio com a adição de 25 g/L de suportes sólidos. Foram mantidas 30°C com uma velocidade de rotação de 200 rpm e uma taxa de aeração de 1,25 – 1,5 (vvm). A espuma gerada na cultura foi introduzida no coletor de espuma, sendo que a espuma de transbordamento na parte inferior do coletor foi reciclada para o fermentador com uma bomba peristáltica. No processo não teve necessidade de adicionar agente antiespumante, sendo monitorado o crescimento de células, o pH, o amônio dissolvido, concentração de amônio-nitrogênio e surfactina em função do tempo. Também em escala de laboratório, Costa; Nitschke e Contiero (2009) utilizaram quatro diferentes culturas de bactérias, dentre elas linhagens de *Bacillus subtilis*, nos quais cresceram em meio de cultura contendo glicose ( $40,0 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (50,0 mM),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (3,0

mM),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3,0 mM),  $\text{CaCl}_2$  (7,0  $\mu\text{M}$ ),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,8 mM), EDTA sódico (4,0  $\mu\text{M}$ ), e  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2,0 mM).7,8, e foram fermentados em frascos Erlenmeyer de 1000 mL, por 72 h, a 200 rpm, 30°C e o pH inicial foi fixado em 6,0. Também em escala de laboratório, em seu estudo de obtenção de surfactina pelo microrganismo *Bacillus subtilis*, Lima Junior (2012) efetuou a fermentação em frascos de Erlenmeyer de 500 mL de capacidade, nos quais em cada frasco contendo 100 mL de meio de cultivo foi inoculado com 10 mL de uma suspensão de  $10^6$  células do *Bacillus subtilis* recém-cultivadas em meio líquido nutriente. Em seguida, os frascos foram colocados em agitador-incubador a 30°C, 150 rpm e posteriormente, em intervalos de 12 e 24 horas foram retiradas amostras dos cultivos para análises de pH, concentração de biomassa, concentração de açúcares e de surfactina.

Estudando as variáveis de processo e ampliação de escala na produção de biosurfactante por *Bacillus subtilis*, Barros (2007) utilizou um fermentador em escala piloto com capacidade para 80 litros aplicando manipueira como substrato. As condições de processo foram 35°C, 15 L/h nas primeiras 12h e 25 L/h durante o restante do processo e agitação de 150 rpm. A recuperação primária do surfactante foi realizada através da coleta da espuma produzida no interior do fermentador.

## 5.5 CONDUÇÃO DO PROCESSO NO BIORREATOR

A forma de condução do processo aplicado ao biorreator é, sem dúvida, um dos aspectos mais importantes para o projeto, estando relacionado ao agente biológico e suas propriedades, ao formato do biorreator utilizado e aos tratamentos finais do processo. Schmidell e Facciotti (2001) destacaram as formas de condução em biorreatores que dentre uma variedade são as mais aplicadas atualmente. Sendo elas: Descontínuo, com um inóculo por tanque ou com recirculação de células; Semicontínuo, sem recirculação de células ou com recirculação; Descontínuo Alimentado, sem recirculação de células ou com recirculação e Contínuo, executado em um reator (com ou sem recirculação de células) ou executado em vários reatores (com ou sem recirculação de células).

### 5.5.1 Tipos de condução

Pereira Junior, Bon e Ferrara (2008) ressaltam que a forma mais utilizada na condução de bioprocessos é a batelada simples, onde se adiciona a suspensão

celular ao meio de cultivo e ocorre sem o acréscimo de um meio novo e sem a retirada do meio reagido durante a operação. De contrapartida, esse formato de operação tem como principal problema a inibição do agente biológico por parte de elevadas concentrações de substrato ou ainda por agentes gerados na própria fermentação. Dessa forma aplica-se a batelada alimentada e suas variantes, que proporciona o controle desses fenômenos. Sendo possível nesse formato de operação, além do controle dos agentes inibidores, a adição de nutrientes que favoreçam o crescimento durante a operação sem ocorrer retirada de material durante o processo.

Segue abaixo alguns exemplos de batelada simples e alimentada:

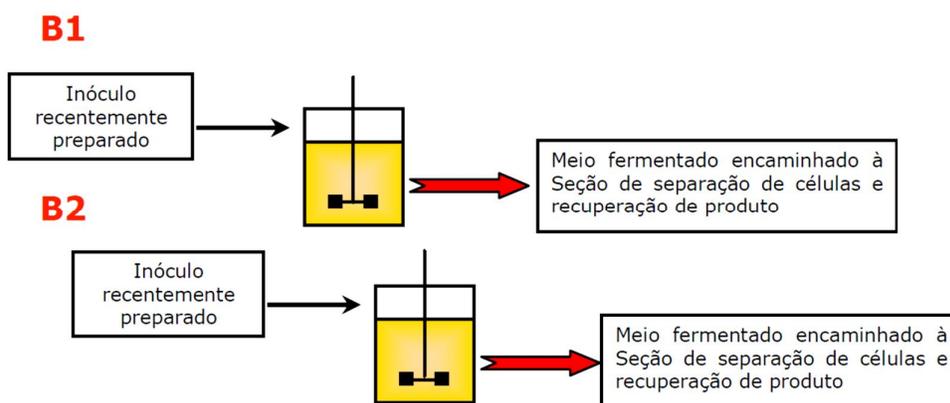


Figura 27 - Batelada com um inóculo para cada biorreator.  
Fonte: (Pereira Junior; Bon; Ferrara, 2008)

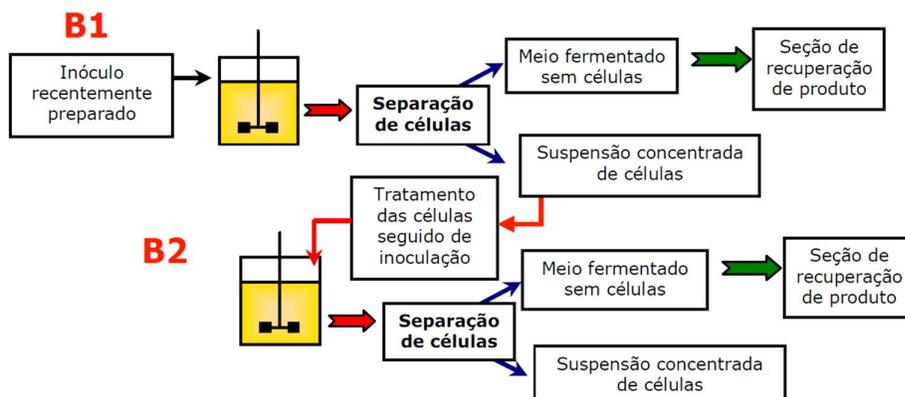


Figura 28 - Batelada com recuperação do inóculo.  
Fonte: (Pereira Junior; Bon e Ferrara, 2008)

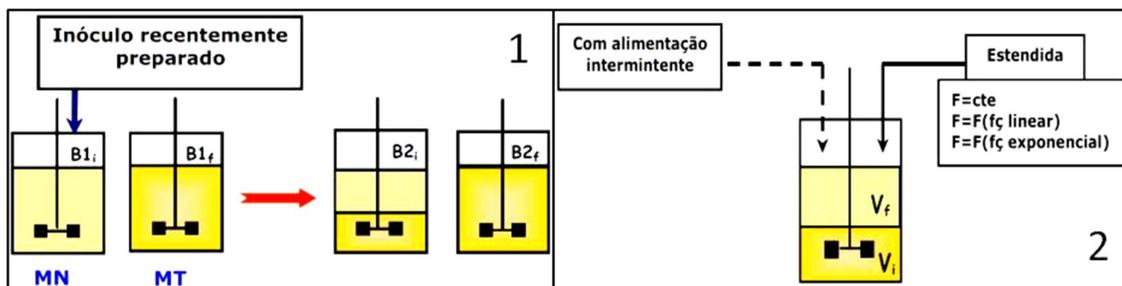


Figura 29 - (1) Batelada seqüencial ou repetida e (2) Batelada alimentada com diferentes formas de alimentação.

Fonte: (Pereira Junior; Bon e Ferrara, 2008)

Notas: Adaptado pelo autor. Sendo: BNi, início da batelada; BNf, final da batelada; MN, meio novo; MT, meio transformado; Vi: volume inicial e Vf: volume final.

Outro formato de operação é a condução contínua, que proporciona a adição de nutrientes e a retirada de meio fermentado durante o processo. Resultando em maiores períodos de processamento e, conseqüentemente, no aumento da produtividade pelo fato de inexistência de tempos improdutivos, das operações anteriores e posteriores fluírem continuamente, automatização do processo, uniformidade do produto e condições ambientais constantes. Contudo, o que definirá a escolha de condução será o estudo da cinética do bioprocessamento (Pereira Junior; Bon e Ferrara, 2008).

Segue abaixo alguns exemplos de processo contínuo:

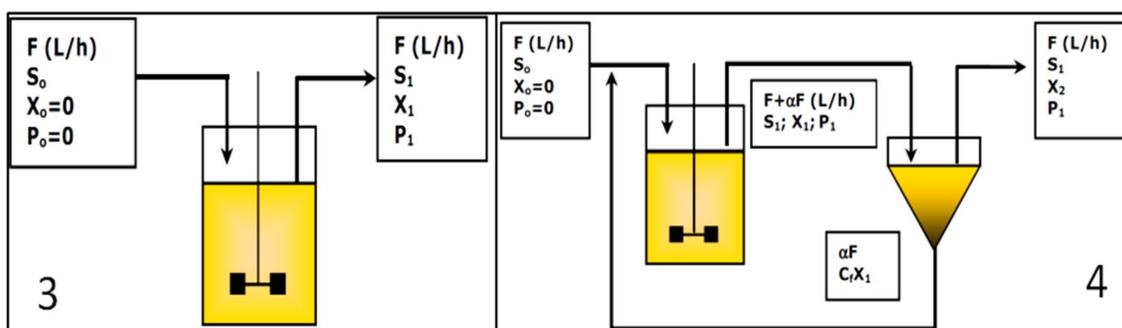


Figura 30 - (3) Processo Contínuo com um único biorreator e (4) Processo Contínuo com um único biorreator e com reciclo de células.

Fonte: (Pereira Junior; Bon e Ferrara, 2008)

Notas: Adaptado pelo autor. Onde: F, vazão de alimentação e de meio transformado; S, concentração de substrato; X, concentração de células; P, concentração de produto (o índice "o" refere-se à condição inicial e o índice "1" às concentrações na corrente que sai do biorreator e o índice "2" às concentrações que saem do separador).  $\alpha$ : razão de reciclo e Cf: fator de concentração de células.

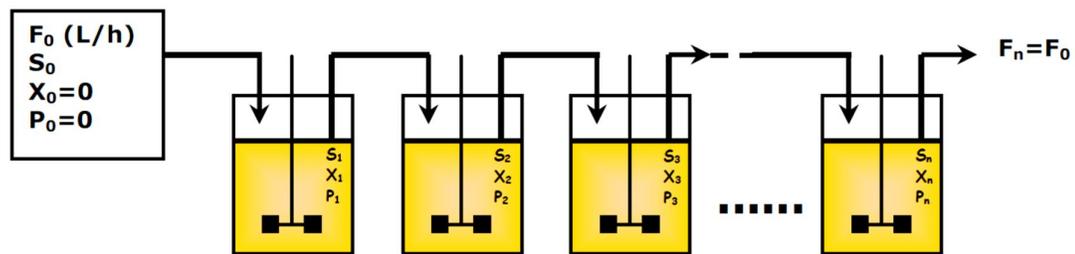


Figura 31 - Processo Contínuo com biorreatores em série sem alimentação adicional.

Fonte: (Pereira Junior; Bon e Ferrara, 2008)

Notas: os índices de S, X e P referem-se aos valores correspondentes à ordem do biorreator da série.

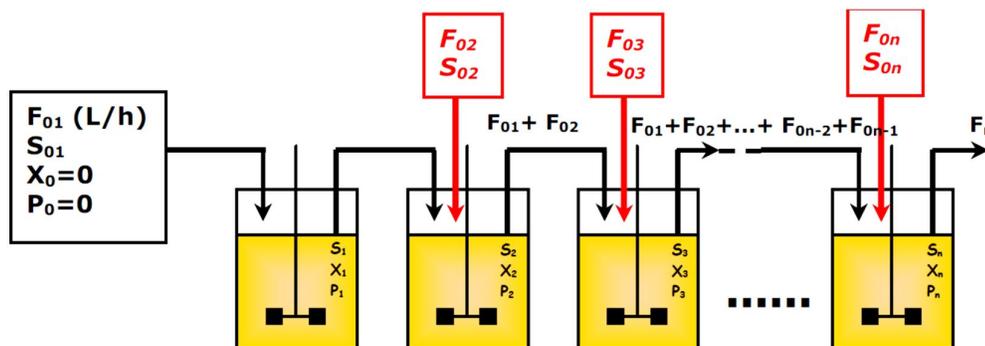


Figura 32 - Processo Contínuo com biorreatores em série com alimentação adicional.

Fonte: (Pereira Junior; Bon e Ferrara, 2008)

Notas: onde os índices de  $F_0$ ; S; X e P referem-se aos valores correspondentes à ordem do biorreator da série.

## 5.6 PROCESSOS PARA A RECUPERAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO.

Após o processamento nos biorreatores, posteriormente à fermentação, ocorre outra etapa tão importante como as demais, sendo a etapa de purificação do produto “Downstream processes”. Como diz Mano (2008), em processos biotecnológicos além da desejável alta produção por parte dos agentes biológicos que atuam como força motriz de um biorreator é necessário, também, empregar de tecnologias eficientes de recuperação, concentração e purificação dos produtos, pela complexidade dos produtos, primários e secundários, gerados no metabolismo dos microrganismos. Kilikian e Pessoa Junior (2001) citam que a diversidade e crescente importância em volta dos produtos biotecnológicos incentivaram o

desenvolvimento de vários processos de purificação. Pelo fato dos produtos serem altamente diversificados, mesmo que não há um processo geral, a purificação pode ser dividida em quatro etapas principais: separação de células e seus fragmentos do meio de cultivo (clarificação); concentração e/ou purificação de baixa resolução, sendo uma separação da molécula desejada de outras moléculas com características físico-químicas diferentes; purificação de alta resolução, quando se separa uma molécula desejada de outras semelhantes e operações de condicionamento final do produto.

Os processos mais aplicados atualmente na etapa “Downstream processes”, segundo Mano (2008), são:

Separção sólido-líquido - métodos mecânicos aplicados em misturas heterogêneas através da retenção do componente sólido usando meio filtrante ou utilizando a diferença de taxa de sedimentação de partículas se movendo no líquido;

Filtração - sendo a técnica de separar suspensões sólido-líquido. Na qual a suspensão, sob pressão, é perpendicularmente direcionada a um meio filtrante. Sendo que, a fração volumétrica que atravessa o meio filtrante é denominada filtrado, e a da contínua deposição das células sobre o meio filtrante, resulta na formação de uma “torta de filtração” (KILIKIAN; PESSOA JUNIOR, 2001);

Sedimentação e Centrifugação – sendo estas as mais utilizadas na biotecnologia, destacando a centrifugação em relação a sedimentação, pela redução da residência e por poder ser aplicado em menor tamanho. Na sedimentação as células em suspensão em meio líquido sofrem este fenômeno através da ação da gravidade, enquanto que na centrifugação ocorre a ação de um campo gravitacional centrífugo. (KILIKIAN; PESSOA JUNIOR, 2001);

Concentração de Produtos – pela composição do filtrado apresentar grande porcentagem de água, ocorre a necessidade de remoção deste líquido, aplicando-se: a Evaporação, processo que requer calor como fase auxiliar na remoção da água; Processos de membrana, variando entre micro, ultra e hiperfiltração distinguindo-se pelo diâmetro dos poros; Extração líquido-líquido, uma das operações mais versáteis aplicando-se em produtos com ampla faixa de propriedades físico-químicas e a Precipitação, método muito aplicado em recuperação de proteínas, sendo a solubilidade reduzida para adição de sais ou solventes orgânicos, podendo ainda, como cita Kim *et al.* (1997 apud Mano, 2008), ser empregada como primeira etapa no processo “Downstream processes” como

forma de remover de imediato pós produtos não desejáveis como ácidos nucleicos, pigmentos dentre outros.

Purificação – sendo esta a fase final e essencial à cadeia de recuperação do produto, se restringindo a processos de sorção, envolvendo a absorção e a adsorção, ocorrendo uma extração por tamanho ou a aderência à superfície de outra molécula.

Barros (2007), na produção de surfactina, recolheu a espuma do processo e a liquefez naturalmente à temperatura ambiente, analisando o volume e pH. Posteriormente, submeteu a amostra ao processo de purificação iniciando com a centrifugação a 12,7 G x 103 por 20 minutos para eliminação de células, sendo o pH ajustado para 2 com solução de HCl e em seguida mantida em repouso por 12 h, aproximadamente, para decantação. Logo, o líquido foi centrifugado a 12,7 G x 103 por 20 minutos, sendo o precipitado recolhido e neutralizado com solução de NaOH e colocado para secar em estufa de secagem a 50°C. Em seguida, o sólido denominado “surfactante bruto”, foi pesado, triturado em almofariz, suspenso em solução de clorofórmio e metanol 65:15 e filtrado em papel de filtro e, posteriormente, foi seco em estufa de secagem a 50°C. O sólido obtido nesta etapa foi denominado “surfactante semipurificado”, foi triturado, pesado e armazenado sob congelamento. Já Hsieh (2007), visando um dimensionamento de um biorreator eficiente, conseguiu um rendimento de aproximadamente 6000 mg.L<sup>-1</sup>. No estudo foi efetuado a centrifugação do caldo de cultura para remoção das células ajustando o pH do sobrenadante a 2,0 por HCl a 3 M precipitando a surfactina. Para a outra purificação, a surfactina bruta foi extraída com um volume igual de diclorometano. Depois a mistura em emulsão foi separada em duas camadas, a camada de solvente foi aspirada na base e a surfactina bruta foi enviada para destilação a vácuo. A pureza deste produto bruto foi de cerca de 60%, sendo que ainda, após sua deionização, foi enviado para a centrifugação para a remoção das substâncias insolúveis e posteriormente seguiu o mesmo processo, alcançando a pureza entre 70 e 80%.

A coleta de espuma gerada no biorreator é o primeiro passo para a purificação do produto, sendo que na mesma está presente grande concentração do biossurfactante, sendo alvo de diversas pesquisas nos dias de hoje (Figura 33). Faria (2010) visando um eficiente e viável sistema de coleta, efetuou a remoção da espuma por meio exaustor acoplado ao fermentador em intervalos de 24 horas para

a fermentação a  $150 \text{ rev. min}^{-1}$  e em intervalos de 12 horas para as fermentações conduzidas à  $250$  e  $350 \text{ rev. min}^{-1}$ . Posteriormente, a espuma foi liquefeita naturalmente em temperatura ambiente e centrifugada a  $18000 \times g$  por 15 minutos, para remoção de células. O sobrenadante adquirido foi então submetido à precipitação ácida por adição de ácido clorídrico concentrado até  $\text{pH} = 2,0$  sendo, então, mantido em repouso por 24 horas em refrigeração a  $4^\circ\text{C}$  para total decantação do extrato bruto contendo o biossurfactante. Em seguida, o precipitado foi separado do sobrenadante por centrifugação nas mesmas condições citadas acima, lavado duas vezes com água acidificada  $\text{pH} = 2,0$ , ressuspensionado em água destilada, congelado e liofilizado. Sendo que ao final da fermentação, o meio de cultivo restante também passou por acidificação para posteriormente recuperar o biossurfactante.

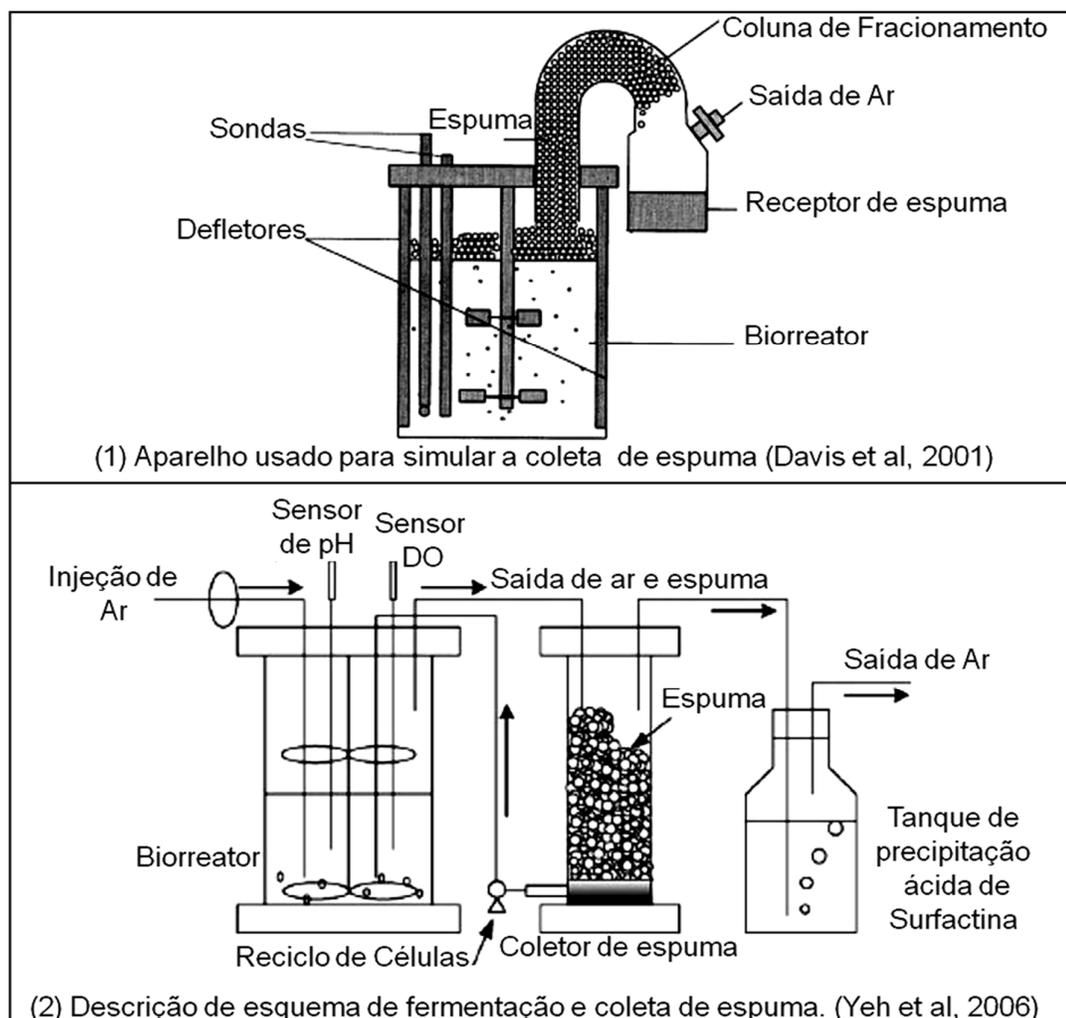


Figura 33 - Protótipos de Biorreatores.

Fonte: (Hsieh , 2007)

Nota: Adaptado pelo autor.

## 6 AVALIAÇÃO PARA VARIAÇÃO DE ESCALA DE PRODUÇÃO

### 6.1 SCALE UP

De modo geral, depois de efetuados experimentos e análises dos resultados em escala de bancada e piloto, o próximo passo é transformar a escala a nível industrial. Como cita Badino Junior e Schmidell (2001), no desenvolvimento de processos químicos, quando encontradas as condições econômicas adequadas de operação em escala de bancada, nos quais valores elevados de produtividade são identificados ocorre a necessidade de se ampliar a escala de produção.

Segundo Bognolo (1999 *apud* BEZERRA, 2006) os custos médios dos biossurfactantes variam de cerca de US\$10,0/mg referente a surfactina purificada (98% de pureza) utilizada em pesquisa biomédica até de US\$2,0/kg a \$4,0/kg para formulações de emulsão propostas no início dos anos 80 para limpeza de tanques e recuperação de óleo. Estimativas no início da década de 90 apontam que o custo dos biossurfactantes varia de US\$3,0/kg a US\$20,0/kg. Atualmente, o preço da surfactina é de R\$ 96,8/mg com teor de pureza acima de 98%. (SIGMA-ALDRICH, c2013). Devido a este alto valor agregado a surfactina e por não existir atualmente processos consolidados para sua produção, pesquisadores estão à procura de processos mais eficientes e com baixo custo.

A variação de escala é um problema comum no ramo de Engenharia Química. Em se tratando de bioprocessos, devem ser conduzidos com tratamentos especiais, pois ainda que se utilizem conceitos aplicados a qualquer outro processo químico neste caso deve-se levar em consideração a presença do microrganismo. Na ampliação de escala, utiliza-se dados obtidos na otimização do processo em escala piloto ou de laboratório para estabelecimento das variáveis de operação na escala industrial, porém muitas vezes ao se ampliar a escala de produção as condições ambientais não se mantêm constantes obtendo assim resultados diferentes e insatisfatórios àqueles obtidos em escalas reduzidas (laboratorial e piloto), sendo essas condições necessárias para ter a reprodutibilidade da atividade fisiológica do microrganismo (o agente da transformação química do substrato em produto) (Pereira Junior; Bon e Ferrara, 2008).

A partir disso, desenvolveram-se vários critérios para ampliação de escala baseados na similaridade geométrica necessária para se conseguir as mesmas respostas obtidas em escalas reduzidas (Figura 34) seguindo suas referentes correlações (Anexo B), como citam Badino Junior e Schmidell (2001). Na qual a aplicação adequada de cada uma delas, ou a sua combinação com outro(s) depende de uma série de fatores, característicos para cada Bioprocessos.

Constância da potência no sistema não aerado por unidade de volume de meio	$\left(\frac{P}{V}\right)$
Constância do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio	$(k_L a)$
Constância da velocidade na extremidade do impelidor	$(v_{tip})$
Constância do tempo de mistura	$(t_m)$
Constância da capacidade de bombeamento do impelidor	$(F_L/V)$
Constância do numero de Reynolds	$(N_{Re})$
Constância da pressão parcial ou concentração de $O_2$ dissolvido	$(C)$

Figura 34 - Critérios de ampliação de escala normalmente recomendados para biorreatores convencionais.

Fonte: (Badino Junior e Schmidell, 2001)

Nota: Adaptada pelo autor.

## 6.2 BIORREATORES DE ESCALA INDUSTRIAL

Após condicionar o meio de cultivo e o agente biológico, as atenções são voltadas para o biorreator, elemento essencial para o processo. Segundo Pereira Junior; Bon e Ferrara, (2008) no biorreator ocorrerão vários fenômenos químicos, físicos e biológicos. Sendo que para a projeção de um biorreator, devem ser levados em consideração os seguintes aspectos: a cinética do Bioprocessos, o cálculo das tubulações e equipamentos necessários para manutenção de esterilidade, as

características hidrodinâmicas do meio reacional, a transferência de massa de nutrientes na célula, a transferência de massa de oxigênio da fase gasosa para o seio do líquido e, posteriormente, para as células (em processos aerados), a transferência de massa de produtos e subprodutos das vizinhanças das células para o seio do meio de cultivo, a transferência de calor metabólico e o controle da fisiologia microbiana.

Badino Junior e Schmidell (2001) ressaltam ao se seguir a simetria geométrica (Figura 34), pode-se chegar a reatores de difícil transferência para as instalações industriais, sendo mais interessante em determinados volumes objetivados no processo deve-se diminuir o número de reatores de grandes dimensões, aumentando o número de reatores com menores dimensões.

Para Shuler e Kargi (2010), geralmente, fermentadores mantêm uma relação entre altura e diâmetro de 2:1 ou 3:1. Sendo que, se a proporção entre altura e diâmetro permanecer constante, então a relação entre superfície e volume diminui drasticamente durante o aumento de escala. Esta alteração reduz a contribuição relativa de arejamento de superfície para fornecimento de oxigênio dissolvido, e remoção de dióxido de carbono em comparação com a contribuição de borbulhamento. Para fermentações bacterianas tradicionais, o arejamento da superfície não é importante, mas, para culturas sensíveis ao cisalhamento pode ser crítico devido a restrições na agitação e no borbulhamento. Sendo de grande importância nas fermentações bacterianas e de fungos o crescimento na parede. Se as células aderirem a elas e se tais células aderentes alterarem o metabolismo, isso afetará os valores na variação de escala. Ainda, em particular, as escalas de tempo relativo para mistura e reação são importantes para determinar o grau de heterogeneidade num fermentador.

### **6.2.3 Tipos e classificação**

Atualmente, o mercado dispõe de grande variedade desse importante equipamento para o bioprocessamento da surfactina. Dessa forma Schmidell e Facciotti (2001) levaram em consideração diversas formas de classificações usuais e elaboraram uma classificação mista e abrangente dos biorreatores (Figura 35) e destacaram que dentre essa grande variedade os mais amplamente aplicados, cerca

de 90% do total de reatores utilizados industrialmente, são os reatores agitados mecanicamente (STR).

<b>Reatores em fase aquosa (fermentação submersa)</b>
<b>Com células/enzimas livres:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reatores agitados mecanicamente (STR: “stirred tank reactor”)</li> <li>• Reatores agitados pneumaticamente           <ul style="list-style-type: none"> <li>- Coluna de bolhas (“bubble column”)</li> <li>- Reatores “air-lift”</li> </ul> </li> <li>• Reatores de fluxo pistonado (“plug-flow”)</li> </ul>
<b>Com células/enzimas imobilizadas em suportes:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reatores com leito fixo</li> <li>• Reatores com leito fluidizado</li> <li>• Outras concepções</li> </ul>
<b>Com células/enzimas confinadas entre membranas:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reatores com membranas planas</li> <li>• Reatores de fibra oca (“hollow-fiber”)</li> </ul>
<b>Reatores em fase não-aquosa (fermentação semi-sólida)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reatores estáticos (reatores com bandejas)</li> <li>• Reatores com agitação (tambor rotativo)</li> <li>• Reatores com leito fixo</li> <li>• Reatores com leito fluidizado gás-sólidos</li> </ul>

Figura 35 - Classificação geral dos biorreatores.

Fonte: Schmidell e Facciotti, 2001.

Nota: Adaptada pelo autor.

Dentre os já estudados para a produção da surfactina, seguem:

Reatores Agitados Mecanicamente (STR: “stirred tank reactor”), segundo Pereira Junior; Bon e Ferrara (2008) são os mais utilizados e estudados industrialmente, apresentando versatilidade e bons resultados a grande gama de processos.

Ele consiste num reator cilíndrico geralmente equipado com chicanas (“baffles”), cuja função é evitar a formação de vórtice durante a agitação do líquido. O agitador é alocado num eixo central do fermentador, contendo ao longo da altura, uma série de turbinas, que podem ser de diferentes tipos sendo mais usuais o de pás planas (“flute blade”):

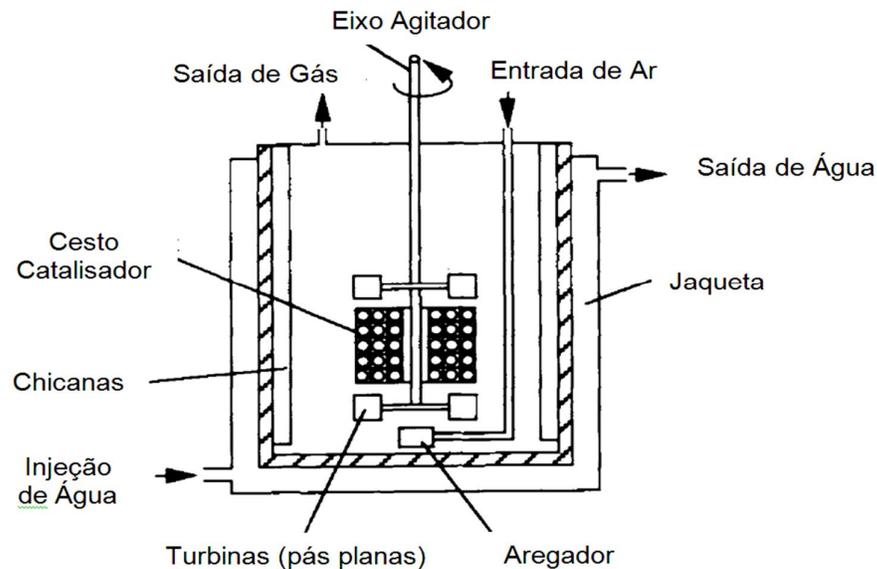


Figura 36 - Modelo de um Reator STR adaptado com cestos catalisadores.  
 Fonte: Tajbl; Simons e Carberry (1966 apud Doran, 1995).  
 Nota: Adaptado pelo autor.

Reatores Agitados Pneumaticamente, no qual a agitação é proporcionada pela atuação de um borbulhador de gás (normalmente ar) no reator sem a presença de um agitador mecânico, resultando assim em menores taxas de cisalhamento nas células (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001). Neste tipo, como cita Pereira Junior; Bon e Ferrara (2008), a potencia necessária para se atingir a mistura desejável no sistema reacional, visando a produção de altas taxas de transferência de calor e massa, é suprida pela energia cinética do líquido através de sua circulação pela movimentação das bolhas, pneumaticamente, contendo ainda elevada relação entre altura e diâmetro que proporcionam maiores retenções de bolhas gasosas no seio do líquido que induzirão o movimento dele pela geração de pressão hidrostáticas na região próxima à distribuição de ar. Esse tipo de reator pode ser classificado como “air-lift” (Figura 37) e “bubble column” (Figura 38), sendo que, diferem entre si pela presença de dispositivos usados para aumentar o grau de mistura, favorecem

escoamento axial, redução da coalescência das bolhas e a equalização das forças cisalhantes ao longo do biorreator.

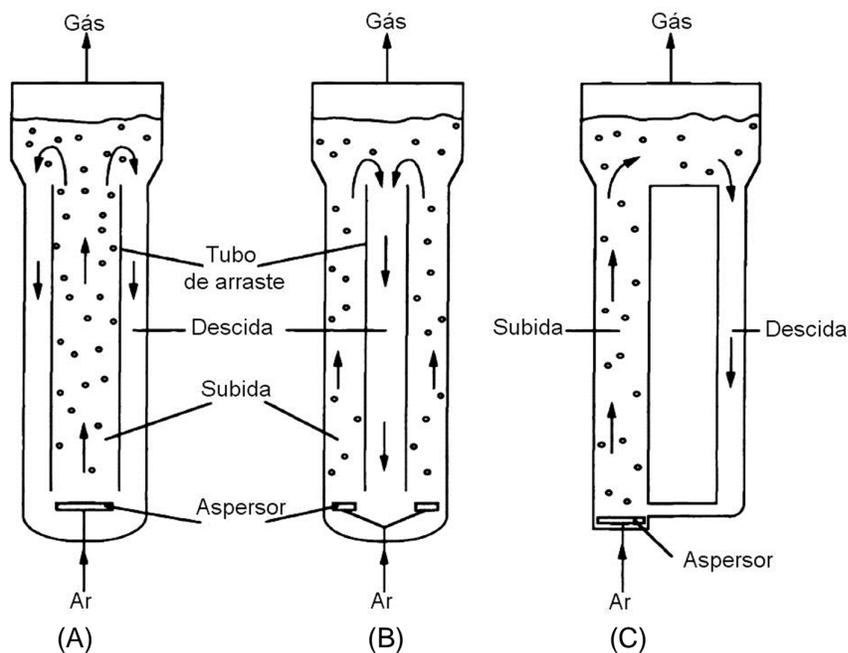


Figura 37 - Configurações de um reator "air-lift".

Fonte: Doran, 1995.

Notas: Adaptado pelo autor. Sendo: (A) e (B) Reatores de circuito interno nos quais os fluxos de descida e subida são separados por defletores interiores e (C) Reator com loop-externo, onde um separador cria curtas seções horizontais na parte superior e inferior.

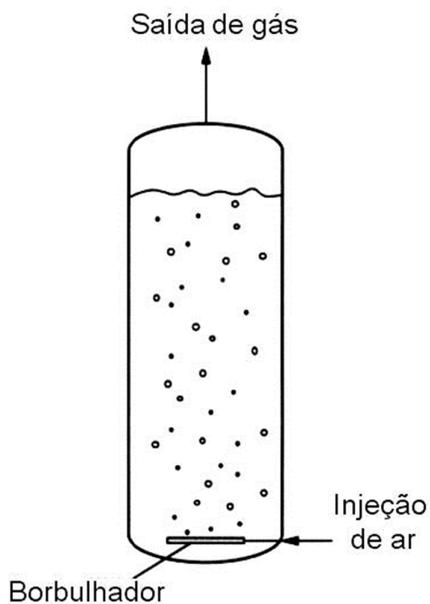


Figura 38 - Biorreator Coluna de Bolhas ("bubble column")

Fonte: Doran, 1995.

Nota: Adaptado pelo autor.

Reatores com células imobilizadas (Figura 39): nos quais as células (biocatalisadores) se encontram imobilizados por um suporte inerte, como, por exemplo, alginato, K-carragena, pectina, materiais cerâmicos, vidro, sílica (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001), ou até mesmo, como aplicou Hsieh (2007) na produção de surfactina, o copolímero poliuretano-poliuréia. Segundo Pereira Junior; Bon e Ferrara (2008), existem várias vantagens associadas à imobilização, como: possibilidade de aplicação em reações enzimáticas de múltiplas etapas; rendimentos e produtividades elevados; estabilidade operacional geralmente alta; operações de extração e/ou purificação de enzimas são desnecessárias; altas densidades celulares podem ser empregadas; densidades celulares e atividades enzimáticas podem ser mantidas por longos períodos de operação; produtos podem ser facilmente separados da biopartícula catalítica e menor suscetibilidade a contaminações microbianas. Por outro lado as seguintes desvantagens potenciais são apresentadas: reações indesejáveis podem ocorrer pela presença de várias enzimas cataliticamente ativas; desprendimento de células do suporte e problemas ligados à transferência de massa intra-particular.

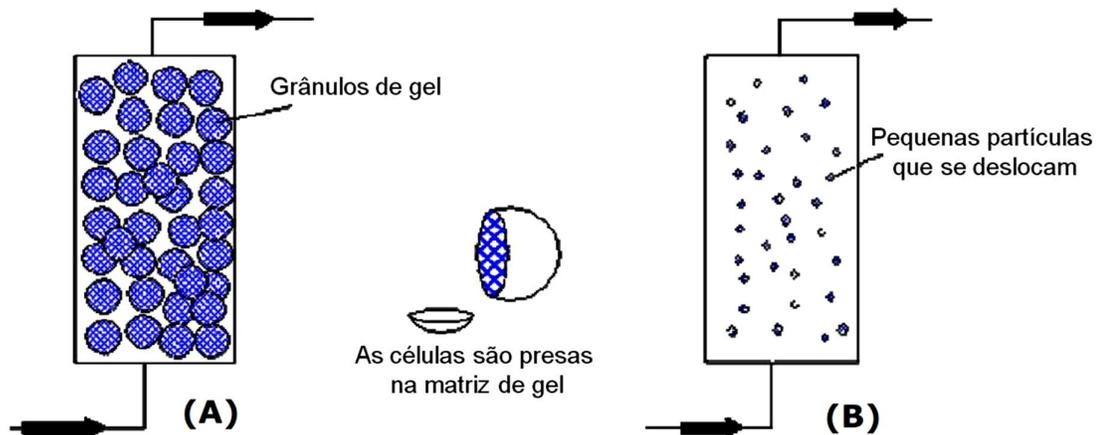


Figura 39 - Biorreatores com células imobilizadas.

Fonte: Pereira Junior; Bon e Ferrara (2008).

Notas: Adaptado pelo autor. Sendo: (A) Leito fixo e (B) Leito fluidizado

## 6.4 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO

Para Pereira Junior; Bon e Ferrara (2008) nesta etapa, as informações de aspectos citológicos e fisiológicos do microrganismo serão de grande importância, ao momento em que a fisiologia microbiana indicará não apenas a geração como também a localização do produto. Se o mesmo for secretado, as etapas de recuperação seguem um roteiro diferente da recuperação do produto intracelular.

A projeção dos equipamentos que irão compor esta etapa, segundo Neto (2001 apud PEREIRA JUNIOR; BON; FERRARA, 2008) dependerá da localização do produto (intracelular ou extracelular), do seu tamanho molecular, concentração, solubilidade, polaridade, volatilidade e de outras propriedades físico-químicas do meio de fermentação, como viscosidade, densidade, impurezas e partículas indesejáveis. A opção pela operação de separação será influenciada pelo tamanho do próprio bioprocessamento e do valor do produto. Os arranjos deverão ser em série a fim de se atingir o grau de pureza requerida (ex. extratos enzimáticos brutos ou enzima purificada) e a forma final exigida para um dado produto (produto cristalizado, liofilizado, líquido concentrado, prensado). A sequência de operações, através da qual o meio contendo a biomolécula a ser separada deve passar para a obtenção de um produto de alta pureza a nível industrial, constitui-se basicamente das quatro etapas a seguir:

1. Remoção de material insolúvel (particulado). Operações comuns: filtração, centrifugação, decantação ou sedimentação;

2. Isolamento primário. Onde a concentração de produto aumenta consideravelmente e substâncias com diferentes polaridades são separadas do produto. Operações típicas: extração por solvente, precipitação e ultrafiltração;

3. Purificação. Destina-se à remoção de impurezas como também concentração de produto. Exemplos são: a precipitação fracionada e muitos tipos de cromatografia líquida de alto desempenho;

4. Isolamento final do produto: Esta última etapa deve fornecer o produto desejado em uma forma adequada para formulação final ou comercialização direta.

As operações aqui incluem: centrifugação e subsequente secagem de um produto cristalizado (liofilizado ou seco por spray drying).

## 6.5 TRATAMENTO BIOLÓGICO DE RESÍDUOS E EFLUENTES

Após a geração de produtos, conseqüentemente gera-se resíduos e efluentes no processo. Em meio a diversas políticas e ideias sustentáveis cabe às indústrias estudarem esses resíduos para que seja dada a destinação adequada aos mesmos, ou ainda, reaproveitá-los para aumentar os rendimentos do processo.

Como resalta Pereira Junior; Bom e Ferrara (2008), o processo de industrialização e o desenvolvimento de tecnologias e produtos cada vez mais avançados, não só o progresso e o bem-estar foram gerados, como também problemas ligados à poluição ambiental foram se acentuando e trouxeram como consequência a necessidade da conscientização quanto à importância da restrição de lançamentos indiscriminados de resíduos nos solos, rios, lagos, oceanos e na atmosfera. Sendo que, para o tratamento de efluentes, prescinde-se, naturalmente, dos cuidados assépticos ou da manutenção de culturas puras, onde compostos intermediários resultantes são transformados em outros até que substâncias não tóxicas sejam geradas, numa cadeia de eventos em que todos os microrganismos desempenham um papel metabólico de vital importância para que a descontaminação/destoxificação do ambiente se estabeleça. Nos quais esse tratamento pode ser idealizado, basicamente, em três etapas:

Tratamento primário, que visa à remoção dos contaminantes mais facilmente separáveis (partículas com tamanho superior a 100  $\mu$ m). As operações típicas aplicadas variam entre gradeamento, desarenamento e desengorduramento;

Tratamentos secundários, onde são retiradas as partículas sedimentáveis, partículas suspensas menores e material solúvel. Estes materiais, em sua grande maioria, são orgânicos, sendo comum o tratamento biológico nestes casos. Essa etapa varia entre a Biotransformação, que constitui da degradação parcial de um composto e na formação de uma ou mais substâncias, que podem ou não ser menos tóxicas que o composto de origem, como também da Mineralização, que é a transformação total de uma substância orgânica em outras inorgânicas, tais como dióxido de carbono e água. Dentre os processos biológicos tradicionais destacam-se: os Lodos ativados (processo contínuo e aerado, com reciclo da microbiota

floculante); a Digestão anaeróbica, que além de reduzir a carga orgânica produz metano; a Nitrificação, processo que possibilita a oxidação de amônia a nitrito e, posteriormente, a nitrato, produzindo um efluente final com baixa demanda bioquímica de oxigênio. E ainda outros tipos de processo, como: lagoas aeradas, biodiscos, filtros percoladores, reatores seqüenciais descontínuos;

Tratamento terciário, no qual é direcionada a remoção de todos ou alguns contaminantes remanescentes, sendo necessária para enquadrar o efluente final às condições de qualidade exigidas para o lançamento e disposição final no ambiente, seja qual for o corpo receptor. Os processos usados nesta etapa incluem tipicamente a filtração, ultra-filtração e adsorção. Podendo ser empregados, em processos mais sofisticados, a eletrodialise e a osmose reversa.

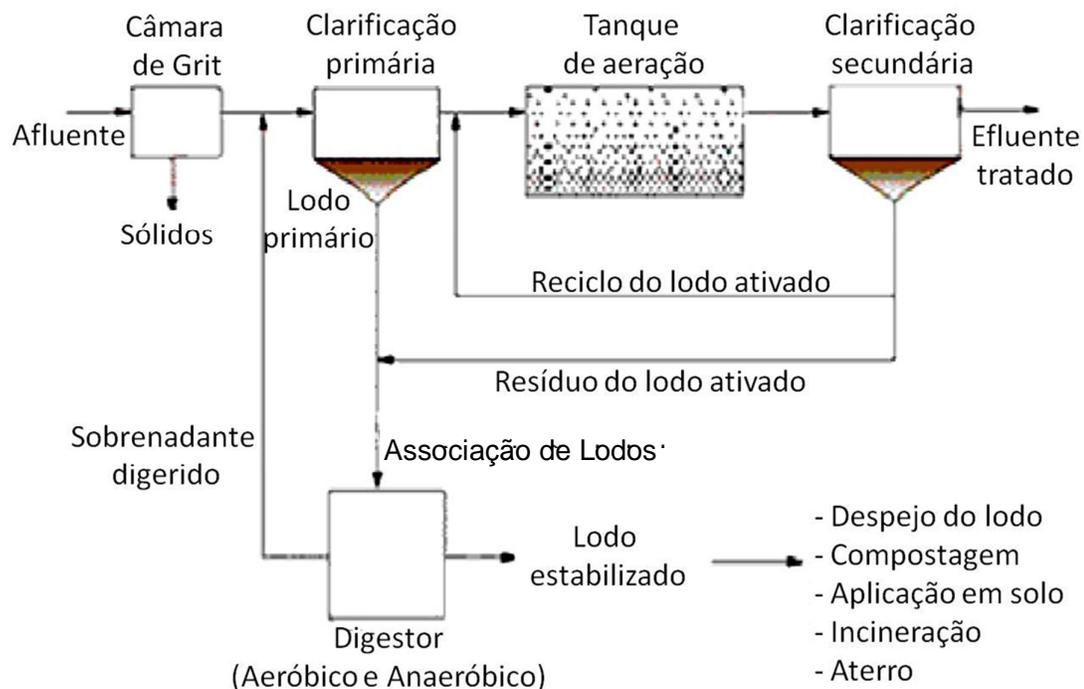


Figura 40 - Representação Esquemática de um Tratamento de Efluentes.  
 Fonte: Davis e Cornwell (1991 apud PEREIRA JUNIOR; BON; FERRARA, 2008)  
 Nota: Adaptado pelo autor

## 6.6 PROJEÇÃO DE PROCESSO

Nos dias atuais, a produção de surfactina, assim como outros biossurfactantes, não tem seu processo consolidado como outros produtos processados através da fermentação, como por exemplo, o álcool etílico e alguns antibióticos. Apesar de que, como este trabalho pode apontar, estão sendo efetuadas diversas pesquisas para obterem-se melhores rendimentos e estabilidade na produção a partir de *Bacillus subtilis*. Sendo que, alguns pesquisadores já estão realizando experimentos com altas produções.

No Brasil, como disponibilizado no site do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), foi efetuado o pedido de patente de nº PI 1102550-6 A2 em maio de 2011 por pesquisadores da Unicamp, referindo-se ao processamento de uma cepa modificada de *Bacillus subtilis* que apresenta um sistema de expressão controlado pela substituição da região promotora e sua aplicação no processamento de surfactina com altos rendimentos, viabilizando a sua produção de forma controlada.

Internacionalmente, de acordo com o portal PATENTSCOPE® (Portal que possibilita o acesso a atividades e serviços relacionados ao Tratado de Cooperação em Matéria de Patentes (PCT)), que é mantido pela Organização Mundial da Propriedade Intelectual (OMPI), existe o registro da patente japonesa de nº WO/2002/026961 com o título "PRODUCTION PROCESS OF SURFACTIN" (Processo de Produção de surfactina) de um processo para a produção de surfactina que compreende uma cultura do gênero *Bacillus* num meio de cultura líquido contendo farinha de soja ou ainda extrato como fonte de nitrogênio, acumulando surfactina no caldo de cultura. Como também, de e um microorganismo do gênero *Bacillus* que tem um potencial para a produção de surfactina bruta numa concentração de 8 a 50 g/L em cultura durante 20 a 90 horas.

De acordo com a patente (nº WO/2002/026961), a produção de surfactina bruta numa concentração de 8 a 50 g/L a partir da linhagem modificada do *Bacillus subtilis*, SD901 (FERM BP-7666), compreende na adição da cultura num meio contendo farinha de soja, extrato de levedura, sendo cultivada com pH entre 6,9 e 7,5 e uma faixa de temperatura de 30 a 37°C durante 20 a 90 horas, sob condições aeróbicas num meio líquido de cultura contendo, ainda, glicose ou maltose como fonte de carbono; nitrato de amônio, sulfato de amônio, cloreto de amônio, acetato de amônio, carbonato de amônio ou bicarbonato de amônio catalisador como uma

fonte de nitrogênio; sais e vitaminas. Em que a concentração de farinha de soja, ou um extrato de levedura em caldo de cultura é entre 0,5 e 20 w/ w %.

Os critérios primários para um projeto, segundo Thiemann (2001), envolve a coleta de dados referentes ao processo biológico a ser desenvolvido, como também à planta a ser construída. Sendo que, os dados do processo englobam informações sobre a cinética do processo, balanços térmicos das reações, condições de assepsia necessárias, propriedades fisiológicas do microrganismo, necessidade de matéria prima e suas características, entre outros. Ressalta ainda, que todas essas informações fazem parte do “know-how” acumulado durante os experimentos em escala de laboratório e piloto, enquanto que os dados relacionados com o projeto da nova planta relacionam, fundamentalmente, com sua localização, capacidade instalada prevista, disponibilidade ou não de água, vapor, eletricidade, volume e características dos efluentes, tratamentos dos mesmos, etc.

A partir desses conceitos e de todas as informações pesquisadas neste trabalho em nível de laboratório e piloto, pode-se compreender a produção de surfactina em escala industrial, baseando em um fluxograma adaptado da produção de enzimas industriais no qual a distribuição dos equipamentos necessários para o processo estão lançados:

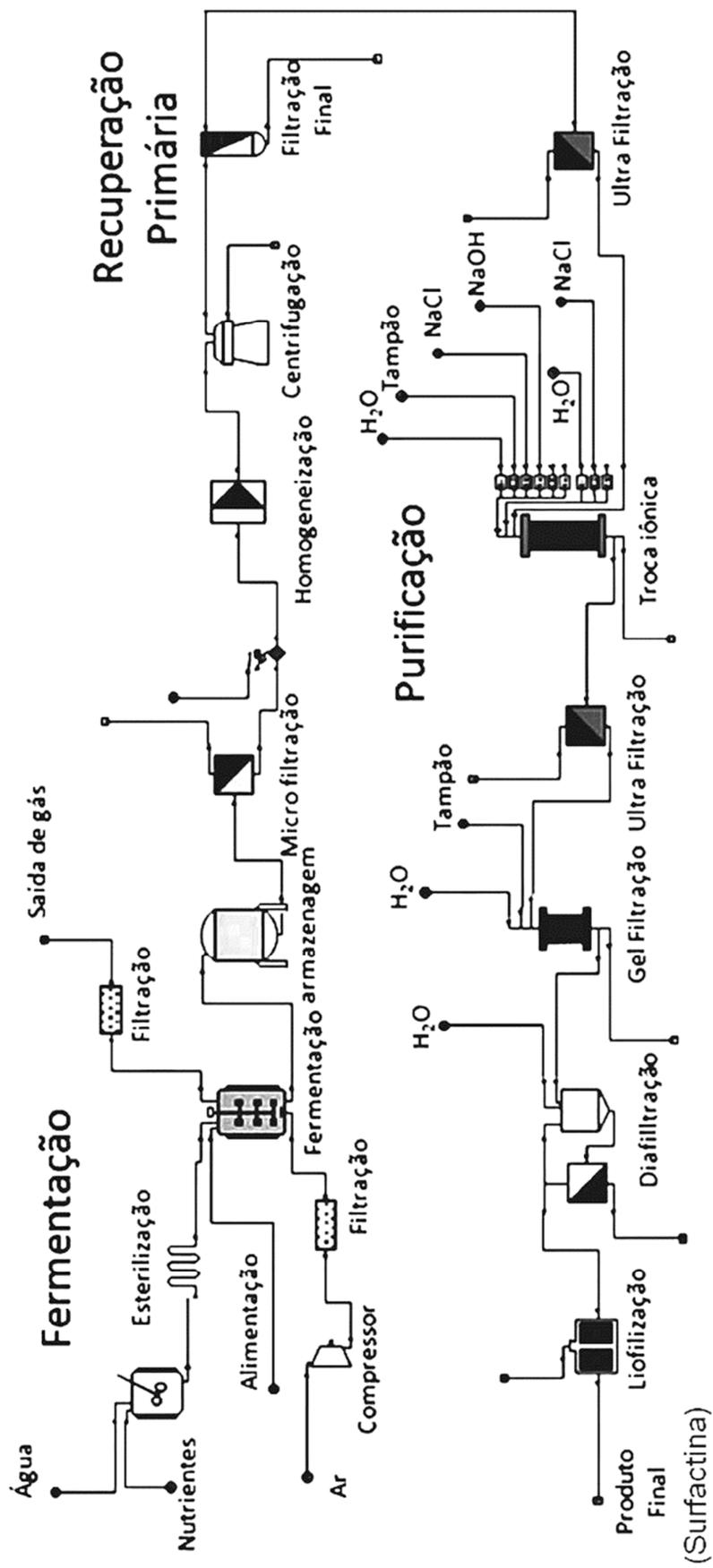


Figura 41 - Etapas utilizadas na produção de enzimas de interesse industrial.

Fonte: (MONTEIRO; SILVA, 2009)

Nota: Adaptado pelo autor.

## 7 CONCLUSÕES

Este trabalho teve por objetivo estudar o processamento do biossurfactante surfactina a partir do *Bacillus subtilis* em escala de laboratório, abordando desde o acondicionamento do microrganismo até os processos de purificação do produto, avaliando os resultados adquiridos por pesquisadores e comparando com princípios teóricos de processos fermentativos. Como também, levantar e avaliar condições nesta escala para futuros estudos de variação da escala de sua produção.

Um planejamento de pesquisa com coleta de dados nacionais e internacionais foi aplicado, passando desde experimentos em Universidades conceituadas até patentes industriais, com o intuito de efetuar uma abordagem do estado da arte desse importante biossurfactante.

A obtenção destes dados tornou possível se chegar às conclusões que seguem:

- Em geral, a produção de biossurfactantes é dependente do metabolismo celular e de acordo com os resultados adquiridos em escala de laboratório o *Bacillus subtilis* se enquadrou nos requisitos propostos por Pereira Junior; Bon e Ferrara (2008) envolvendo eficiência na conversão de substrato em produto; estabilidade sob condições extremas de pressão osmótica do meio, temperatura e força iônica; resistência e tolerância a substâncias tóxicas;
- O meio de cultivo, base para o desenvolvimento do microrganismo, nos diferentes experimentos fundamentou-se na fonte de carbono, nitrogênio, fósforo e elementos traços;
- A abordagem da cinética nas diversas pesquisas já realizadas chegou a resultados importantes quanto às variáveis do processo como tensão superficial, nos quais atingiram-se valores mínimos em torno de  $28 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ; temperatura e pH, otimizadas em torno de  $30^\circ\text{C}$  e 6,5, respectivamente; oxigenação e agitação em torno de 1,5 (vvm) e 300 rpm, respectivamente e formação de produto chegando à, aproximadamente, 6000 mg/L.
- Nas etapas de recuperação observadas aplicou-se eficientemente a centrifugação e precipitação ácida.

A partir disso, foi possível observar o grande potencial industrial apresentado pela surfactina, sendo um biossurfactante eficaz e eficiente. Como também, a

aplicação de recursos renováveis como matéria-prima favoreceu a redução de custos no processo como também a valorização do meio ambiente.

Contudo, ainda que já exista um processo patenteado com elevado potencial de produção da surfactina bruta, numa concentração de 8 a 50 g/L em cultura durante 20 a 90 horas como pôde ser observado no trabalho, e há intensas pesquisas para a otimização do seu processamento, isso nos remete a um futuro próspero desse poderoso biossurfactante.

## REFERÊNCIAS

ALTERTHUMM, F. Elementos de Microbiologia. In: BORZANI, W. *et al.* (Coord.) **Biotecnologia Industrial Vol. 1: Fundamentos**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001.

ANDRADE, C. J. **Estudo da utilização do glicerol oriundo da cadeia do biodiesel por *Bacillus subtilis* para a produção de biossurfactantes, enzimas e aromas**. 2011. 140f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - UNICAMP, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2011. Disponível em: <[http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver\\_documento.php?did=2203](http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=2203)>. Acesso em: 01 set. 2013.

ARAUJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M.. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 6, p. 848-858, abr. 2013. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422013000600019&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422013000600019&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 02 set. 2013.

BADINO JUNIOR, A. C. e SCHMIDELL, W. Variação de Escala. . In: SCHMIDELL, W *et al.* (Coord.). **Biotecnologia Industrial Vol. 2: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001.

BARBOSA, S. A. **Desenvolvimento de biodetergentes utilizando biossurfactantes como matéria-prima**. 2011, 128f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Núcleo de Pós-Graduação do RENORBIO, Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, SE, 2011. Disponível em: <[http://bdtd.ufs.br/tde\\_busca/arquivo.php?codArquivo=649](http://bdtd.ufs.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=649)>. Acesso em: 14 set. 2013.

BARROS, F. F. C. **Estudo das Variáveis de Processo e Ampliação de Escala na Produção de Biossurfactante por *Bacillus subtilis* em manipueira**. 2007. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - UNICAMP, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2007. Disponível em: [http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver\\_documento.php?did=402](http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=402). Acesso em: 03 de set. 2013.

BARROS, F. F. C. **Obtenção de compostos de aroma, enzimas e biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* em manipueira**. 2011. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – UNICAMP, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2011. Disponível em: <[http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver\\_documento.php?did=2213](http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=2213)>. Acesso em: 28 de ago. 2008.

BEZERRA, M. S. **Levantamento e avaliação de critérios para a ampliação de escala da produção de biossurfactantes utilizando melão como substrato**. 2006, Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos), UFRN, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Natal, 2006. Disponível em: <<http://ftp.ufrn.br/pub/biblioteca/ext/bdtd/MarcioSB.pdf>>. Acesso em: 10 de ago. 2013.

BORZANI, W. Processo biotecnológico industrial genérico. In: BORZANI, W. *et al.* (Coord.). **Biotecnologia Industrial Vol. 1: fundamentos**. São Paulo, SP: Edgar Blücher, 2001.

BRASIL. Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. **Estudo prospectivo Visão de Futuro e Agenda INI - Biotecnologia: 2008-2025**. Brasília, DF: ABDI, 2010a. 222 p. (Série Cadernos da Indústria ABDI). Disponível em: <<http://www.abdi.com.br/Estudo/Estudo%20Prospectivo%20Biotecnologia.pdf>>. Acesso em: 2 ago. 2013.

BRASIL. Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. **Panorama Setorial Biotecnologia**. Brasília, DF: ABDI, 2010b. 222 p. (Série Cadernos da Indústria ABDI). Disponível em: <http://www.abdi.com.br/Estudo/Panorama%20Setorial%20Biotecnologia.pdf>. Acesso em: 02 de ago. 2013.

COSTA, J. A. V., MARTINS, R. G., PINTO, M. H. Avaliação Cinética da Produção de Biosurfactantes Bacterianos. **Química Nova**, São Paulo, Vol. 32, No. 8, 2104-2108, 2009. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422002000500013&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000500013&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 03 jul. 2013.

COSTA, S.G.V.A.O.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Produção de biotensoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.1, p. 34 – 38, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v28n1/06.pdf>>. Acesso em: 01 de Julho de 2013.

FARIA, A. F. **Produção, purificação e caracterização química de biosurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* em glicerina residual**. 2010. 153f. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) - UNICAMP, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2005. Disponível em: <[http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver\\_documento.php?did=1182](http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=1182)>. Acesso em: 30 de ago. 2013.

FELIX, A. K. N. **Caracterização e estudo da aplicabilidade do biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 a partir do suco de caju**. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/ri/handle/riufc/4431>>. Acesso em: 13 de ago. 2013.

FILIP, B.; FILIP S.; KRISTIAAN N. Electrophoresis. **Universiteit Gent**, c2013. Disponível em: <<http://lcp.elis.ugent.be/research/electrophoresis>>. Acesso em: 20 out. 2013.

GRUPO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DO IST. Avaliação quantitativa do crescimento microbiano. **E-Escola**, 2005. Disponível em: <<http://www.e-escola.pt/site/topico.asp?id=235&ordem=1>>. Acesso em: 25 ago. 2013.

Hiss, Haroldo M. C. R. Cinética de Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W et al. (Coord.). **Biotecnologia Industrial Vol. 2: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001.

HSIEH, C. **Bioreactor design and operation strategies for repeated surfactin fermentation**. 2007. 82f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, National Cheng Kung University, 701 Tainan, Taiwan, 2007. Disponível em: <[http://etdncku.lib.ncku.edu.tw/ETD-db/ETD-search/view\\_etd?URN=etd-0710107-115336](http://etdncku.lib.ncku.edu.tw/ETD-db/ETD-search/view_etd?URN=etd-0710107-115336)>. Acesso em 10 ago. 2013.

KILIKIAN, B. V. e PESSOA JUNIOR, A. Purificação de Produtos Biotecnológicos. In: SCHMIDELL, W *et al.* (Coord.). **Biotecnologia Industrial Vol. 2**: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blucher, 2001.

LIMA JUNIOR, G. A. L. **Obtenção de Surfactina Pelo Micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633**. 2012, 48f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - UFPR, Setor de Ciências da Saúde, Curitiba, 2012. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080//dspace/handle/1884/29019>>. Acesso em: 26 de ago. 2013.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. An update on use unconventional substrates for biosurfactants production and their applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.58, p.428-434, 2002. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-001-0924-1>>. Acessado em: 10 ago. 2013.

MANO, M. C. R. **Estudo da recuperação, concentração e purificação de biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis***. 2008. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – UNICAMP, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2008. Disponível em: <[http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver\\_documento.php?did=519](http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=519)>. Acesso em: 28 ago. 2013.

MATSUURA, A. B. J. **Produção e caracterização de biosurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação**. 2004. 82f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - UNICAMP, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2004. Disponível em: [http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver\\_documento.php?did=121](http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=121). Acesso em: 01 set. 2013.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, v.3, n.5, ano 3, jan/jun 2009. Disponível em: <[http://www.rpqsena.org.br/index.php?option=com\\_k2&view=itemlist&task=category&id=16:edi%C3%A7%C3%A3o-5](http://www.rpqsena.org.br/index.php?option=com_k2&view=itemlist&task=category&id=16:edi%C3%A7%C3%A3o-5)>. Acesso em: 02 jul. 2013.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. **Journal of Hazardous Materials**. v. 85, p. 111–125. 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389401002242>>. Acesso em: 25 de set. 2013.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfatantes a partir de resíduos agroindustriais. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, ano 6, nº 31, p. 63-67, jul./dez. 2003. Disponível em: <[http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio31/biosurf\\_agro.pdf](http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio31/biosurf_agro.pdf)>. Acesso em: 30 jul. 2013.

NITSCHKE, M; PASTORE, G. M.. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 772-776, set. 2002 . Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422002000500013&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000500013&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 3 jul. 2013.

PEREIRA JUNIOR, N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Tecnologia de Bioprocessos**: volume 1. Rio de Janeiro, RJ: Escola de Química/UFRJ, 2008. Disponível em: <<http://www.ladebio.org.br/producao-cientifica/livros/>>. Acesso em: 01 ago. 2013.

RIBEIRO FILHO, W.. A Biotecnologia no Brasil. **Revista Processos Químicos**, Anápolis, GO, v.3, n.5, ano 3, p. 127-132, jan./jun. 2009. Disponível em: <[http://www.rpqsenai.org.br/index.php?option=com\\_k2&view=itemlist&task=category&id=16:edi%C3%A7%C3%A3o-5](http://www.rpqsenai.org.br/index.php?option=com_k2&view=itemlist&task=category&id=16:edi%C3%A7%C3%A3o-5)>. Acesso em: 03 jul. 2013.

SCHMIDELL, W e FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W *et al.* (Coord.). **Biotecnologia Industrial**: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher, v. 2, 2001.

SHULER, M. S., KARGI, F. **Bioprocess Engineering**: basic Concepts. New York: Prentice Hall, 2010. 553p.

Thiemann, J. E. Construção de Equipamentos de Fermentação. In: BORZANI, W. *et al.* (Coord.). **Biotecnologia Industrial**: Fundamentos. São Paulo: Edgar Blücher, v. 1, 2001.

WHANG, L.-M. *et al.*. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. **Journal of Hazardous Materials**. v. 151, n.1, p. 155-163. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17614195>. Acesso em: 30 de set. 2013.

## ANEXO A – Meios de Cultivo

Meios utilizados em experimentos com o microrganismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633, aplicando resíduo de soja (melaço) em diferentes concentrações de açúcares totais e meio formulado com base na composição centesimal do produto e do micro-organismo (Lima Junior, 2012):

- Meio formulado: glicose 16,28 g.L <sup>-1</sup> ; extrato de levedura 16,90 g.L <sup>-1</sup> ; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,55 g.L <sup>-1</sup> ; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,55 g.L <sup>-1</sup> ; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,25 g.L <sup>-1</sup> ; CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,24 g.L <sup>-1</sup> ; NaCl 0,13 g.L <sup>-1</sup> ; FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,054 g.L <sup>-1</sup>
- Meio formulado com melaço de soja 2% (corresponde a 20 g.L <sup>-1</sup> de açúcares totais): 71 g.L <sup>-1</sup> de melaço de soja; FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,5 g.L <sup>-1</sup> ; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,8 g.L <sup>-1</sup> ; NaCl 0,8 g.L <sup>-1</sup> ; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 3,45 g.L <sup>-1</sup> ; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 g.L <sup>-1</sup> ; ureia 10,4 g.L <sup>-1</sup>
- Meio formulado com melaço de soja 4% (corresponde a 40 g.L <sup>-1</sup> de açúcares totais): 142 g.L <sup>-1</sup> de melaço de soja; FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,5 g.L <sup>-1</sup> ; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,8 g.L <sup>-1</sup> ; NaCl 0,8 g.L <sup>-1</sup> ; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 3,45 g.L <sup>-1</sup> ; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 g.L <sup>-1</sup> ; ureia 10,4 g.L <sup>-1</sup>
- Meio formulado com melaço de soja 6% (corresponde a 60 g.L <sup>-1</sup> de açúcares totais): 213 g.L <sup>-1</sup> de melaço de soja; FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,5 g.L <sup>-1</sup> ; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,8 g.L <sup>-1</sup> ; NaCl 0,8 g.L <sup>-1</sup> ; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 3,45 g.L <sup>-1</sup> ; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 g.L <sup>-1</sup> ; ureia 10,4 g.L <sup>-1</sup>

## ANEXO B - Correlações

Correlações aplicadas com base nos critérios de variação de escala (Figura 34), abordados por Badino Junior e Schmidell (2001):

Na ampliação de escala de 1 para 2, mantendo-se o  $\left(\frac{P}{V}\right)$  constante, temos:

Regime laminar:

$$\left(\frac{P}{V}\right) \propto N^2$$

Assim:

$$\left(\frac{P}{V}\right)_1 = \left(\frac{P}{V}\right)_2$$

ou,

$$N_1^2 = N_2^2$$

Regime Turbulento ( $N_{Re} > 10^4$ ):

$$\left(\frac{P}{V}\right) \propto N^3 D_i^2$$

Assim:

$$\left(\frac{P}{V}\right)_1 = \left(\frac{P}{V}\right)_2$$

ou,

$$N_1^3 D_{i_1}^2 = N_2^3 D_{i_2}^2$$

Sendo:

$P$ : potência transmitida na agitação (W)

$V$ : volume do tanque (m<sup>3</sup>)

$N$ : frequência de rotação (rps ou s<sup>-1</sup>)

$D_i$ : diâmetro do impelidor (m)

Na ampliação de escala de 1 para 2, mantendo-se o  $(k_L a)$  constante, temos:

$$k_L a \propto \left(\frac{P_g}{V}\right)^A (V_S)^B$$

Assim:

$$(k_L a)_1 = (k_L a)_2$$

Ou,

$$\left(\frac{P_g}{V}\right)_1^A (V_S)_1^B = \left(\frac{P_g}{V}\right)_2^A (V_S)_2^B$$

Sendo:

$k_L a$  : coeficiente volumétrico de transferência de  $O_2$  ( $h^{-1}$ )

$P_g$  : potência transmitida ao fluido sob aeração (W)

$V$  : volume de fluido ( $m^3$ )

$V_S$  : velocidade superficial ( $m.s^{-1}$ )

A e B: constante das dimensões do tanque

Na ampliação de escala de 1 para 2, mantendo-se o  $(v_{tip})$  constante, temos:

$$v_{tip} \propto ND_i$$

Assim:

$$(v_{tip})_1 = (v_{tip})_2$$

Ou,

$$N_1 D_i = N_2 D_i$$

Sendo:

$v_{tip}$  : constante de velocidade na extremidade do impelidor ( $cm/s^3$ )

$N$  : frequência de rotação (rps ou  $s^{-1}$ )

$D_i$  : diâmetro do impelidor (m)

Na ampliação de escala de 1 para 2, mantendo-se o  $(t_m)$  constante, temos p/  $(N_{Re} > 10^5)$ ,  $H_L$  e  $D_T$  proporcionais a  $D_i$ :

$$t_m \propto \left(\frac{D_i}{N^4}\right)^{\frac{1}{6}}$$

Assim:

$$(t_m)_1 = (t_m)_2$$

ou,

$$\left(\frac{D_{i1}}{N_1^4}\right)^{\frac{1}{6}} = \left(\frac{D_{i2}}{N_2^4}\right)^{\frac{1}{6}}$$

Sendo:

$t_m$ : tempo de mistura (s)

$N$ : frequência de rotação (rps ou  $s^{-1}$ )

$D_i$ : diâmetro do impelidor (m)

$H_L$ : altura da coluna de fluido (m)

$D_T$ : diâmetro do impelidor (m)

Na translação de escala de 1 para 2, mantendo-se o  $(F_L/V)$  constante, temos:

$$\frac{F_L}{V} \propto N$$

Assim:

$$\left(\frac{F_L}{V}\right)_1 = \left(\frac{F_L}{V}\right)_2$$

Ou,

$$N_1 = N_2$$

Sendo:

$F_L$ : vazão de circulação do fluido no interior do tanque ( $1/t_c$  (tempo de circulação característico))

$V$ : volume de líquido ( $m^3$ )

$N$ : frequência de rotação (rps ou  $s^{-1}$ )

Na ampliação de escala de 1 para 2, mantendo-se o  $(N_{Re})$  constante, temos:

$$N_{Re} \propto ND_i^2$$

Assim:

$$(N_{Re})_1 = (N_{Re})_2$$

ou,

$$N_1 D_{i_1}^2 = N_2 D_{i_2}^2$$

Sendo:

$N_{Re}$ : número de Reynolds (adimensional)

$N$ : frequência de rotação (rps ou  $s^{-1}$ )

$D_i$ : diâmetro do impelidor (m)

Na ampliação de escala de 1 para 2, mantendo-se a vazão específica de ar

$(\phi_{ar})$  constante, temos:

$$\phi_{ar} (vvm) = \frac{v_{ar}}{v_{meio} t} = \frac{Q}{V}$$

Assim, sabendo-se que  $V \propto D_i^3$ :

$$\left( \frac{Q_1}{D_{i_1}^3} \right) = \left( \frac{Q_2}{D_{i_2}^3} \right)$$

Sendo:

$\Phi$ : vazão específica de ar (vvm)

$U$ : vazão de ar e meio ( $m^3/s$ )

$V$ : volume de meio ( $m^3$ )

$t$ : tempo (s)

$D_i$ : diâmetro do impelidor (m)

$Q$ : vazão ( $m^3/s$ )