

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

Simulação dinâmica da produção de biossurfactantes pelas bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens* utilizando modelo cinético de Monod.

Mariana Julia Gomes da Silva

Trabalho de Graduação apresentado ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Ruy de Sousa Júnior

São Carlos - SP

2022

BANCA EXAMINADORA

Trabalho de Graduação apresentado no dia 12 de setembro de 2022 perante a seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Ruy de Sousa Júnior, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCar).

Convidado: Mestra em Eng. Química Ana Bárbara Moulin Cansian, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCar).

Professor da Disciplina: Prof. Dr. Ruy de Sousa Júnior, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCar).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por seus cuidados disfarçados em milagres diários.

Em segundo lugar, a minha família que ofereceu todo seu amor, compreensão e carinho, principalmente quando eu estava longe. Especialmente a minha mãe, pelas ligações diárias, por todo o suporte e amor incondicional, que me deu forças para que terminasse a graduação.

Ao meu professor e orientador Ruy, que ofereceu todo seu conhecimento, atenção, dedicação e paciência para me ajudar a elaborar cada parte deste Trabalho de Graduação.

Aos meus amigos de São Carlos, especialmente as minhas amigas Natasha, Sofia, Bruna, Letícia e Dallissa, agradeço por dividirem a casa, as aulas, as festas e vida comigo. Ao meu amigo João Victor, que foi meu amigo e companhia nas matérias, compartilhando todo o conhecimento e suporte em todas as atividades, dentro e fora da graduação. Ao Felipe, que dividiu comigo muitas responsabilidades, muitas reuniões na sexta à noite e me ensinou com exemplos diários a ser uma pessoa muito mais empática.

Aos meus amigos de Hortolândia, em especial a Larissa e a Carol, que foram a minha família e o meu apoio em uma cidade completamente nova. Agradeço também por me ensinarem tanto sobre processos, produtos e equipamentos, que me tornaram uma profissional melhor e me ajudaram a criar outra imagem sobre a engenharia.

Ao meu namorado Matheus, que mesmos nos momentos mais difíceis me enche de amor e apoio, me ensinando diariamente a ser mais tolerante, paciente, calma e gentil. Para além, agradeço infinitamente a sua família, Marilza, Marcos e Milena, que me acolheram com tanto carinho.

RESUMO

Os surfactantes são compostos tensoativos com características anfipáticas devido a presença de estruturas hidrofílicas e hidrofóbicas na mesma molécula, o que lhes proporciona a propriedade de se distribuir entre duas fases imiscíveis ocasionando a diminuição de tensão interfacial e superficial. A produção dessas moléculas pode advir de rotas sintéticas ou biológicas, sendo que a sintética utiliza derivados de petróleo e as biológicas utilizam-se de metabólicos celulares ou de enzimas. A exploração da rota microbiológica advém da crescente preocupação ambiental para a substituição de produtos à base de petróleo por produtos menos poluentes, pois os surfactantes produzidos por rota química têm maior toxicidade para os seres vivos e sua aplicação pode resultar em contaminação ambiental de solos e ambientes aquáticos. Comparativamente, os biosurfactantes tem características biodegradáveis e atóxicas, podem possuir poder tensoativo superior aos de rota sintética, além de apresentarem estabilidade em ampla faixa de temperatura, pH e força iônica. Este trabalho se concretiza em uma revisão bibliográfica sobre os surfactantes, os biosurfactantes e suas principais utilizações na indústria, em especial na indústria petroquímica. Para além, objetivou-se modelar e simular a produção de biosurfactante por via respiratória, utilizando o software livre Scilab 6.1.1.. Através da definição de uma cinética para consumo dos dois substratos (frações pesadas de petróleo, n-Hexadecano e n-Eicosano), para o crescimento celular de duas bactérias produtoras de biosurfactantes (Bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*) e acumulação de bioproduto (Biosurfactante Ramnolipídio), foi organizado um sistema de equações diferenciais ordinárias, baseado no modelo cinético de Monod proposto por Sakthpriya *et al.* (2016). Os resultados obtidos reforçam a possibilidade do uso das duas bactérias para a degradação dessas frações pesadas de hidrocarbonetos, evidenciados pelo consumo da massa de substrato em função da formação de novos biosurfactantes. Mesmo com uma produtividade baixa para a aplicação industrial, a análise a partir dos dados de Baixo Rendimento, que foi calculado a partir da biomassa média produzida por unidade de massa de substrato consumido (g.g^{-1}), teve como maior produção quantitativa o n-Eicosano como substrato e *P. aeruginosa* como célula bacteriana, chegando à concentração de $0,12 \text{ g.L}^{-1}$. Já para o modelo desenvolvido com os valores de Alto Rendimento, a maior concentração de biosurfactante utilizou n-Hexadecano como substrato e *P. aeruginosa* como bactéria, chegando a uma concentração máxima de $5,45 \text{ g.L}^{-1}$.

ABSTRACT

Surfactants are tensoative compounds with amphipathic characteristics, due to the presence of hydrophilic and hydrophobic structures in the same molecule, which gives them the property of distributing themselves between two immiscible phases from the reduction of interfacial and surface tension. The production of these molecules can come from synthetic or biological routes, with the synthetic route using petroleum derivatives and the biological route using cellular metabolites or enzymes. The exploration of the microbiological route comes from the growing environmental concern for the substitution of petroleum-based products by less polluting ones, because the surfactants produced by the chemical route have greater toxicity to living beings and its application may result in environmental contamination of soils and aquatic environments. In comparison, biosurfactants have biodegradable and non-toxic characteristics, may have higher surfactant power than those from the synthetic route, and are stable over a wide range of temperature, pH, and ionic strength. This work is a literature review on surfactants, biosurfactants and their main uses in the industry, especially in the petrochemical industry. In addition, the objective was to model and simulate the production of biosurfactant by respiration, using the free software Scilab 6.1.1. By defining a kinetics for consumption of the two substrates (heavy petroleum fractions, n-Hexadecane and n-Eicosane), for cell growth of two biosurfactant-producing bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* bacteria) and accumulation of bioproduct (Rhamnolipid biosurfactant), a system of ordinary differential equations was organized, based on Monod's kinetic model proposed by Sakthipriya et al. (2016). The results obtained reinforce the possibility of using the two bacteria for the degradation of these heavy hydrocarbon fractions, evidenced by the consumption of substrate mass as a function of the formation of new biosurfactants. Even with a low productivity for industrial application, the analysis from the low yield data, which was calculated from the average biomass produced per unit of substrate mass consumed (g.g⁻¹), had the highest quantitative production with n-Eicosane as substrate and *P. aeruginosa* as bacterial cell, reaching the concentration of 0.12 g.L⁻¹. For the model developed with the High Yield values, the highest concentration of biosurfactant used n-hexadecane as substrate and *P. aeruginosa* as bacteria, reaching a maximum concentration of 5.45 g.L⁻¹.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1.	Surfactantes	3
2.2.	Biossurfactantes	10
2.3.	Bactérias Pseudomonas	15
2.4.	Cinética química de produção de Biossurfactantes.....	18
2.5.	Produção comercial de biossurfactantes	22
2.6.	Aplicação de biossurfactantes	23
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1.	Procedimento de Cálculo	25
3.1.1.	Modelo cinético de Monod.....	26
3.1.1.1.	Parâmetros – Baixo Rendimento	28
3.1.2.1.	Parâmetros – Alto rendimento.....	30
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	34
4.1.	Modelo cinético de Monod – Baixo Rendimento	34
4.2.	Modelo cinético de Monod – Alto Rendimento.....	38
5.	CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	42
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
	APÊNDICE A	48
	APÊNDICE B.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Exemplos de diferentes interfaces: líquido/ar (1) e líquido/líquido (2).....	5
Figura 2.2. Estrutura dos diferentes tipos de agregados de moléculas surfactantes.....	6
Figura 2.3. Representação das variações das propriedades físico-químicas em função da concentração de surfactante.....	8
Figura 2.4. Estrutura Química do Biosurfactante Rhamnolipídeo.....	12
Figura 2.5. Bactéria <i>Pseudomona P. aeruginosa</i> em teste colorimétrico de Gram, utilizando microscópio ótico com aumento de 100x.....	15
Figura 2.6. Bactéria <i>Pseudomona P. fluorescens</i> em microscópio ótico com aumento de 500x.....	16
Figura 2.7. Representação das taxas de crescimento microbiano e da densidade microbiana em cada etapa do Crescimento celular.....	21
Figura 4.1. Variação da concentração de Células de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , a partir do consumo de substrato n-Hexadecano, através da cinética de Monod com $Y_{P/X}$ de baixo rendimento.....	34
Figura 4.2. Variação da concentração de Células de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , a partir do consumo de substrato n-Hexadecano, através da cinética de Monod com $Y_{P/X}$ de baixo rendimento.....	34
Figura 4.3. Variação da concentração de Células de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , a partir do consumo de substrato n-Eicosano, através da cinética Monod com $Y_{P/X}$ de baixo rendimento.....	35
Figura 4.4. Variação da concentração de Células de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , a partir do consumo de substrato n-Eicosano, através da cinética de Monod com $Y_{P/X}$ de baixo rendimento.....	36
Figura 4.5. Variação da concentração de Células de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , a partir do consumo de substrato n-Hexadecano, através da cinética de Monod com $Y_{P/X}$ de alto rendimento.....	37
Figura 4.6. Variação da concentração de Células de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , a partir do consumo de substrato n-Hexadecano, através da cinética de Monod com $Y_{P/X}$ de alto rendimento.....	38
Figura 4.7. Variação da concentração de Células de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , a partir do consumo de substrato n-Eicosano, através da cinética de Monod com $Y_{P/X}$ de alto rendimento.....	39

Figura 4.8. Variação da concentração de Células de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , a partir do consumo de substrato n- Eicosano, através da cinética de Monod com $Y_{P/X}$ de alto rendimento.....	39
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1. Propriedades dos surfactantes, suas funções e exemplos de aplicação.....	8
Quadro 2.2. Classificação dos Biosurfactantes e os principais microrganismos.....	12
Quadro 2.3. Descrição das Fases do crescimento celular, descritas através da cinética de Monod.....	20
Quadro 4.1. Resumo das principais variáveis da cinética celular de Monod, com $Y_{P/X}$ de baixo rendimento, após 1000 horas de experimento.....	36
Quadro 4.2. Resumo das principais variáveis da cinética celular de Monod, com $Y_{P/X}$ de Alto Rendimento, após 1000 horas de experimento.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Parâmetros cinéticos de Monod de Baixo Rendimento – <i>P. aeruginosa</i> e n-Hexadecano.....	27
Tabela 3.2. Parâmetros cinéticos de Monod de Baixo Rendimento – <i>P. fluorescens</i> e n-Hexadecano.....	28
Tabela 3.3. Parâmetros cinéticos de Monod de Baixo Rendimento – <i>P. aeruginosa</i> e n-Eicosano.....	28
Tabela 3.4. Parâmetros cinéticos de Monod de Baixo Rendimento – <i>P. fluorescens</i> e n-Eicosano.....	28
Tabela 3.5. Parâmetros Iniciais utilizados nas Simulações a partir do modelo de Monod de Baixo Rendimento.....	29
Tabela 3.6. Parâmetros cinéticos de Monod de Alto Rendimento – <i>P. aeruginosa</i> e n-Hexadecano.....	30
Tabela 3.7. Parâmetros cinéticos de Monod de Alto Rendimento – <i>P. fluorescens</i> e n-Hexadecano.....	30
Tabela 3.8. Parâmetros cinéticos de Monod de Alto Rendimento – <i>P. aeruginosa</i> e n-Eicosano.....	31

Tabela 3.9. Parâmetros cinéticos de Monod de Alto Rendimento – <i>P. fluorescens</i> e n-Eicosano.....	31
Tabela 3.9.1. Parâmetros Iniciais utilizados nas Simulações a partir do modelo de Monod de Baixo Rendimento.....	32

1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes são compostos tensoativos com características anfipáticas, apresentando estruturas hidrofílicas e hidrofóbicas na mesma molécula. Devido à presença desses grupos polares e apolares, as moléculas surfactantes podem se distribuir entre duas fases imiscíveis, como água e óleo, de acordo com a polaridade de maior afinidade com os meios. A partir desse fenômeno, ocorre a formação de um filme molecular responsável pela redução da tensão interfacial e superficial, auxiliando na emulsificação de soluções através da formação de agregados químicos conhecidos por micelas (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

A grande maioria dos surfactantes comerciais são sintetizados quimicamente a partir de derivados de petróleo, o que acarreta produtos potencialmente poluentes e prejudiciais ao meio ambiente (BUENO, 2008). Dessa forma, através da perspectiva biotecnológica sobre desenvolvimento de soluções com maior apelo ambiental, os biossurfactantes tornam-se uma opção atrativa, de origem microbiana, animal, vegetal ou enzimática. Esses compostos de origem microbiana são menos tóxicos, biodegradáveis, com maior capacidade de formar agregados moleculares e elevada atividade biológica, podendo atuar até como antibióticos farmacêuticos (SAKTHPRIYA, 2015). As bactérias englobam o maior número de espécies produtoras de biossurfactantes, devido ao seu metabolismo simplificado e amplamente estudado (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Esses biossurfactantes têm diversos ramos de aplicações industriais, decorrente de sua capacidade de detergência, emulsificação, lubrificação, ação espumante/antiespumante e a capacidade molhante, demonstrando bom desempenho em condições críticas de processo, que envolvem parâmetros como a temperatura, a salinidade e o pH. Uma das principais aplicações dos biossurfactantes é na indústria petroquímica, podendo atuar em diversas funcionalidades, como no aumento da eficiência da extração de petróleo, na etapa de Recuperação Avançada ou no propósito de atenuar a perda de eficiência na extração de petróleo dos reservatórios naturais, melhorar a qualidade dos produtos extraídos e diminuir o impacto ambiental de possíveis vazamentos (FELIPE & DIAS, 2016).

Na extração de petróleo offshore, que ocorre em plataformas em alto mar instaladas sobre reservatórios, podem ocorrer depósitos das frações mais pesadas de hidrocarbonetos nas tubulações, o que impacta diretamente no entupimento, gerando prejuízos à operação devido à queda de vazão e à diminuição do raio do encanamento. Nessa aplicação, os

biossurfactantes ajudam a quebrar as frações de cadeias longas em cadeias curtas, aumentando a eficiência da extração e otimizando a solubilidade da emulsão nas tubulações.

No entanto, os biossurfactantes de origem bacteriana ainda não alcançaram plenamente a produção em escala industrial devido aos altos custos de produção e purificação, que são associados ao uso de substratos caros, à baixa produtividade celular e às etapas de separação da molécula de interesse do meio celular (NITSCHKE & PASTORE, 2002). Os microrganismos utilizam os substratos para a obtenção de energia, que é empregada em seus processos metabólicos, como na manutenção de suas atividades de sobrevivência, no crescimento celular e em reprodução (SANTA ANNA, 2001). Entretanto, é possível melhorar a síntese dessas moléculas, entendendo as variáveis que afetam o metabolismo dos microrganismos produtores de biossurfactantes, em especial, das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*, que tem sua produção baseada em Ramnolipídios (MAYER, 2001; SAKTHPRIYA, 2015).

Assim, a proposta desse trabalho baseia-se em uma revisão bibliográfica sobre os biossurfactantes e suas principais utilizações na indústria, em especial na indústria petroquímica, somada a uma simulação computacional do crescimento cinético das bactérias *Pseudomonas* no software SciLab 6.1.1. Essa simulação tem como base dados disponíveis na literatura de referência e se motiva a partir de uma comparação entre duas espécies de bactérias *Pseudomonas*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*, para a produção de biossurfactantes. Dessa forma, determinou-se quantitativamente a produção de biossurfactante a partir do consumo de substratos formados por n-Hexadecano e n-Eicosano, utilizando a modelagem diferencial para o crescimento celular das bactérias através de um sistema de equações diferenciais, utilizando a cinética de Monod de Baixo e de Alto Rendimento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Surfactantes

Os surfactantes são compostos químicos tensoativos com características anfipáticas/anfifílicas devido à presença de uma porção hidrofílica, solúvel em meio aquoso, e uma região hidrofóbica, solúvel em lipídios e solventes orgânicos. Cada molécula é composta por duas estruturas, uma cauda constituída por cadeias poliméricas longas e simétricas, que contém grupos apolares nas extremidades, e a cabeça, que é formada por um grupo polar (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002; SANTOS *et al*, 2002; SAKTHPRIYA, 2015).

A cauda hidrofóbica pode ser formada por cadeias de Carbono e Hidrogênio (Hidrocarbonetos), por cadeias de Flúor e Carbono (Fluorocarbonos) ou de Silício e Carbono (Siloxanos) (FELIPE & DIAS, 2016). Já a cabeça hidrofílica, é normalmente classificada de acordo com a carga da cabeça polar, sendo que se o grupo principal tiver carga negativa ou positiva, é denominado aniônico ou catiônico, respectivamente. Se contiver ambas as cargas (positivas e negativas), o surfactante é denominado zwitteriônico e se o grupo principal não tiver cargas elétricas o surfactante é chamado de não-iônico. (CHEVALIER *et al*, 1991; NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Os surfactantes aniônicos apresentam em sua estrutura um grupo funcional com carga negativa, formado em sua maioria por íons de potássio, sódio, cálcio e aminas aquil protonadas organizados em estruturas polares de sulfonatos, carboxilatos, sulfatos e fosfatos (NITSCHKE & PASTORE, 2002; SOUZA, 2011). Outra característica é que, quando dissolvido ou disperso em água, apresenta cargas negativas, o que lhes configura uma capacidade alta de espumação e umectação, tornando-os os principais produtos utilizados em sabões, shampoos, sabonetes e detergentes. Devido à característica de formação de espuma, são também os principais compostos encontrados nas espumas de rios e corpos de água, levando em média de 12 a 15 dias para se degradar (BUENO, 2008; NITSCHKE & PASTORE, 2002). O Lauril Éter Sulfato de Sódio é o agente surfactante aniônico mais utilizado nas indústrias de cosméticos devido ao seu baixo preço, principalmente na fabricação de shampoos (BUENO, 2008).

Nos surfactantes catiônicos, o grupo hidrofílico é positivo, formado em sua maioria por aminas de nitrogênio quaternário, grupos sulfônicos ou de fosfônio. Como o nitrogênio é mais eletronegativo que o carbono, os tensoativos catiônicos podem apresentar carga

positiva parcial, atraindo-se pelos elétrons e causando uma redução na polaridade da parte nucleofílica da molécula. Dessa forma, a relação entre os surfactantes catiônicos e a água é menor, assim como o seu poder de detergência, sendo que a sua maior aplicação é na modificação da superfície de sólidos, utilizados como amaciantes de tecidos, agentes antissépticos, dispersantes e anticorrosivos (CHEVALIER *et al.*, 1991; TADROS, 2014).

Os surfactantes zwitteriônicos, ou anfóteros, apresentam uma estrutura molecular composta por grupos iônicos positivos e negativos, sendo que na grande parte das vezes o positivo é composto por um nitrogênio quaternário e o negativo contém sulfatos, carboxilatos ou fosfatos (CHEVALIER *et al.*, 1991). As características desse tipo de tensoativo variam de acordo com o pH do meio reacional, de forma que quando o pH está ácido, o grupo aniônico será protonado e o tensoativo terá características catiônicas e se o pH da solução estiver alcalino o grupo catiônico será protonado e o tensoativo se comportará como um composto aniônico. Em pH neutro os dois grupos terão a mesma ionização, resultando em um ponto isoelétrico sem cargas e se comportando como um surfactante não-iônico (MANIASSO, 2001; SAKTHPRIYA, 2015; TADROS, 2014). Dessa forma, a mudança do pH altera estrutura da molécula e as suas propriedades, como por exemplo a capacidade de detergência e a formação de espumas. Os zwitteriônicos possuem características de alta biodegradabilidade em água, baixa toxicidade, alto poder detergente, além de não causar irritação na pele e em mucosas, transformando-o assim em uma ótima opção para a confecção de produtos destinados a higiene pessoal, como em shampoos, hidratantes e demaquilantes (TADROS, 2014). No entanto, são pouco utilizados devido ao alto custo de produção.

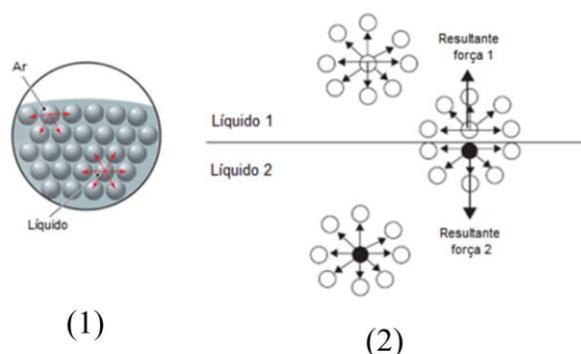
Já os surfactantes não iônicos não possuem cargas elétricas, de forma que não se ionizam quando dispersos em meios aquosos. São formados em sua maioria por óxidos de etileno e a densidade da carga elétrica está dispersa entre vários átomos de oxigênio, provenientes das ligações formadas pelos óxidos de etenos. Os tensoativos não-iônicos são empregados em conjunto com os outros surfactantes devido ao fato de não apresentarem cargas localizadas e assim, serem menos suscetíveis a neutralizar outros surfactantes (TADROS, 2014). Além disso, são os únicos liberados para uso alimentar, podendo ser utilizados na neutralização da quantidade de bolhas em uma fritura, por exemplo (BUENO, 2008; CHEVALIER, 1991).

As moléculas surfactantes podem se distribuir entre os limites de duas fases imiscíveis, como água e óleo, localizando-se de acordo com a polaridade de maior afinidade entre os meios. Com esse fenômeno, ocorre a formação de um filme molecular responsável pela

redução da tensão interfacial e superficial, através da diminuição da área superficial de contato e do aumento da capacidade de umectação do solvente do meio (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

A tensão superficial é o efeito físico resultante da interação das forças de coesão e repulsão das moléculas no interior de um fluido, atuando na interface de fases gasosas e líquidas. No interior dos fluidos, as moléculas sofrem ação de forças de coesão e repulsão pelas moléculas vizinhas, resultando em um vetor nulo e no equilíbrio de forças. Já na interface líquido/gás ocorre um desequilíbrio dessas forças, na medida em que as moléculas posicionadas na superfície do líquido sofrem apenas interações com as moléculas posicionadas lateralmente no líquido, exibindo uma força atrativa mais forte sobre as moléculas vizinhas mais próximas na superfície (HEWITT, 2002). Consequentemente, a energia das moléculas é maior na superfície do líquido do que no seu interior e a orientação do vetor resultante é direcionado para o interior do líquido. Para minimizar essa área de superfície e manter o equilíbrio, as moléculas de líquido tendem a adotar uma forma que minimize sua área superficial e o número de vizinhos (HEWITT, 2002). De modo resumido, a tensão superficial pode ser definida como o trabalho necessário para aumentar a área superficial em um processo isotérmico reversível, de modo a aumentar o equilíbrio entre as superfícies, proporcionando um vetor nulo (HEWITT, 2002). As moléculas surfactantes agem na medida em que a natureza anfifílica delas promove o equilíbrio entre as forças intermoleculares da superfície, resultando na redução da tensão superficial ou interfacial. Na Figura 2.1. disposta é possível observar exemplos de duas interfaces diferentes: líquido/ar (1) e líquido/líquido (2). (SANTIAGO, 2019).

Figura 2.1. Exemplos de diferentes interfaces: líquido/ar (1) e líquido/líquido (2).

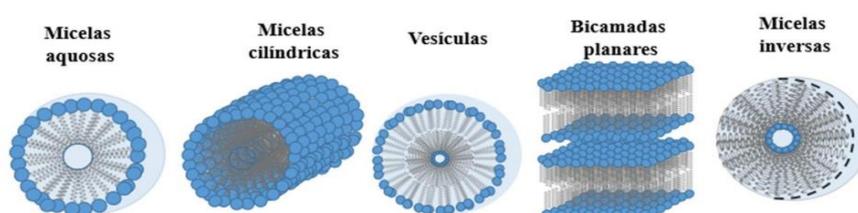


Fonte: Adaptado de Santiago (2019).

Quando as moléculas anfifílicas são misturadas em solventes em condições de saturação e agitação, independentemente de sua polaridade do meio, elas tendem a formar estruturas esféricas conhecidas como micelas, resultando em diferentes tipos de agregados químicos (SAKTHPRIYA, 2015). Um dos fatores de eficiência de um surfactante pode ser determinado através da capacidade de auto associação para formação micelar, que pode ser medida através do CMC (Concentração Micelar Crítica), sendo que esse fator influencia diretamente na capacidade de redução da tensão superficial na interface gás-líquido, além da caracterizar a capacidade de emulsificação relacionada a estabilização de misturas (MUHAMMAD, 2018; OTZEN, 2017). Assim, quando os surfactantes são adicionados a soluções aquosas a tensão superficial é diminuída pois as moléculas de surfactantes formam as micelas a fim de diminuir a repulsão entre os grupos hidrofóbicos e a substância aquosa (DRAKONTIS, 2020).

O parâmetro CMC é determinado a partir da solubilidade do surfactante no líquido, representando a máxima concentração de monômeros e é influenciada por características do meio como o pH, temperatura e força iônica (MUHAMMAD, 2018). Para a sua determinação, utilizam-se técnicas com potenciômetros, dado que durante a formação dos agregados, os grupos hidrofílicos se aproximam e geram uma repulsão eletrostática, que se opõe ao processo de micelização. Nessa etapa, é possível aferir a carga elétrica formada através de um potenciômetro (ADETUNJI, 2006). Quanto menor for o CMC, mais eficiente é o surfactante visto que menor é a quantidade necessária para diminuição da tensão superficial (DRAKONTIS, 2020). A estrutura das micelas é proporcional ao CMC, quando a concentração está abaixo do CMC, apresentam-se sob a forma de monômeros e acima ou na região do CMC as moléculas se apresentam sob a forma de micelas. Quando em concentrações muito elevadas as moléculas constituem estruturas de arranjos cilíndricos formadas por micelas (MUHAMMAD, 2018). Essas estruturas formam diferentes tipos de agregados que podem ser visualizados na Figura 2.2. abaixo:

Figura 2.2. Estrutura dos diferentes tipos de agregados de moléculas surfactantes

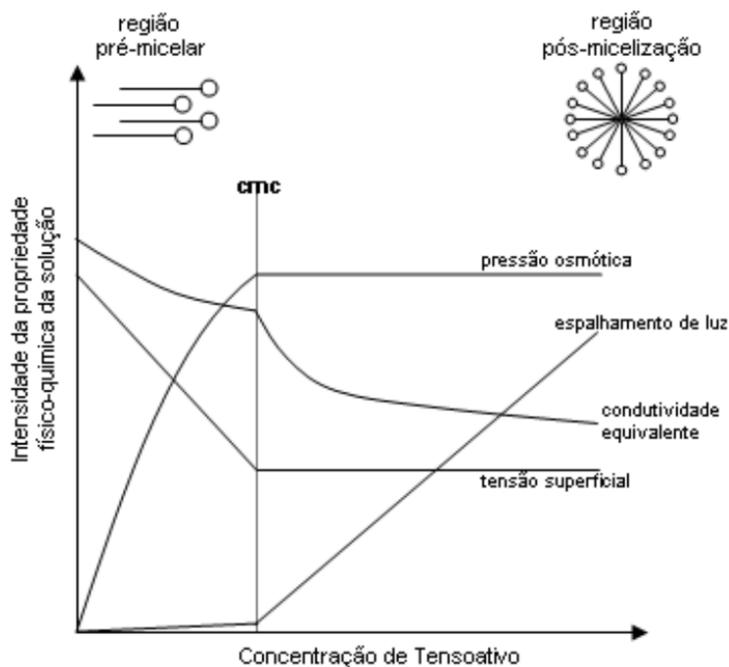


Fonte: Adaptado de Medina (2017).

As duas estruturas mais comuns para agregados de micelas são as estruturas de Micelas Aquosas e a de Micelas Inversas. A estrutura de micelas aquosas retrata o comportamento da molécula surfactante quando o tensoativo está inserido em meio aquoso e polar, e dessa forma a cabeça está em contato com o meio polar e cauda apolar e hidrofóbica está voltada para o meio da estrutura micelar, formando um aglomerado no ambiente hidrofóbico. Já na estrutura de Micelas Inversas, a molécula surfactante está inserida em um solvente apolar com uma pequena quantidade de água no centro e assim, a parte hidrofílica está voltada ao núcleo aquoso, enquanto as caudas hidrofóbicas ficam voltadas para o meio apolar e a adição de mais água implicaria no aumento do volume da estrutura (ARGENTON, 2009). Os fosfolípidios são os principais constituintes das membranas celulares (MUHAMMAD, 2018). A estrutura de bicamada planar é encontrada na membrana celular e se organiza de forma que as cabeças (hidrofílicas) se voltem para o lado exterior da membrana, enquanto as caudas (hidrofóbicas) se voltem para o interior. Dessa forma, a membrana se torna seletiva através do sistema de difusão simples, sendo que somente as substâncias lipossolúveis a atravesse, como os hormônios (LEHNINGER, 2017).

Dessa forma, através da determinação da CMC é possível aferir as propriedades esperadas nos surfactantes. A CMC é uma propriedade intrínseca à molécula, o que a torna característica de cada surfactante, de forma a depender do tamanho da cadeia, do grupo hidrofílico e das condições experimentais (força iônica, temperatura, presença de sais), sendo assim, qualquer alteração na estrutura molecular irá também alterar o valor da CMC (ARGENTON, 2009; MUHAMMAD, 2018; SANTIAGO, 2019). A Figura 2.3. abaixo representa de forma gráfica a variação dessas características, tanto na região pré-micelização quanto na região pós-micelização, marcadas pela linha da CMC.

Figura 2.3. Representação das variações das propriedades físico-químicas em função da concentração de surfactante.



Fonte: Adaptado de Argenton (2009).

Essas características de comportamentos diferentes em cada meio proporcionam aos surfactantes amplas aplicabilidades em processos industriais, tendo capacidade de interferir na emulsificação, na detergência, na capacidade espumante/antiespumante e na dispersão de fases de diversos materiais e produtos (NITSCHKE & PASTORE, 2002). No Quadro 2.1., encontra-se um resumo sobre as múltiplos efeitos, as funcionalidades e a aplicabilidade de um surfactante.

Quadro 2.1. Propriedades dos surfactantes, suas funções e exemplos de aplicação.

Efeito do Surfactante	Função	Aplicabilidade
Emulsionantes e dispersantes	Auxiliam na formação de emulsões estáveis, através do favorecimento da dispersão entre fases com diferentes polaridades.	Indústria alimentícia, cosmética, em tintas e como biorremediador.
Agentes molhantes e penetrantes.	Atuam na capacidade de um líquido de se espalhar em uma superfície, através da redução da tensão superficial.	Produtos farmacêuticos, cosméticos e de tintas. Podem ser utilizados para exploração de petróleo.

Espumante	Auxilia na estabilidade da espuma, aumentando a resistência das bolhas	Indústria alimentícia, de higiene e de cosméticos.
Antiespumante	Atuam na estrutura da espuma, causando diminuição das bolhas através do efeito de redução da elasticidade.	Recuperação de petróleo, indústrias de bens de consumo, alimentícias e de cosméticos.
Detergência	Possibilitam a remoção de partículas de óleo de superfícies.	Produtos de limpeza e em defensivos agrícolas.
Espessante	Promovem consistência e textura de produtos.	Indústria alimentícia e de tintas.
Formação de estruturas micelares	Capacidade de agregação.	Sistemas de detecção de substâncias tóxicas.
Biocida	Interferem em determinados processos metabólicos vitais de microrganismos.	Controle biológico de determinadas pragas.

Fonte: Adaptado de Nitschke & Pastore (2002).

Um exemplo do uso de surfactantes seria na indústria petroleira, na remediação de vazamentos ou descartes inadequados de substâncias oleosas que podem atingir e contaminar os recursos hídricos e os solos (NITSCHKE & PASTORE, 2002; SAKTHPRIYA, 2015). Além de remediador químico, é amplamente utilizado em diversas operações de exploração e prospecção de petróleo, podendo agir de forma a evitar a formação de agregados sólidos de óleo na tubulação de extração, que causa o entupimento da mesma e acarreta prejuízos à operação (MULLIGAN; YONG; GIBBS, 2001 *apud* BUENO, 2008). Outra aplicação ocorre na otimização dessa extração, que ocorre em três etapas distintas, cada qual com a sua complexidade.

A primeira etapa é a Recuperação Primária que compreende a quantidade de hidrocarbonetos recuperados de forma natural pela energia contida no reservatório que se desprende a partir do influxo de água e da formação de gases nesses reservatórios, que podem deslocar o petróleo através de sua movimentação. A eficiência desse processo geralmente é baixa, pois ocorre uma diminuição natural da pressão do reservatório ao longo do tempo, o que culmina na diminuição da energia natural de recuperação (FENIBO *et al*, 2019, THOMAS 2004).

A Recuperação Secundária é frequentemente utilizada na extração, podendo ser conhecida como Método Convencional de Recuperação. Durante o processo, é adicionada uma quantidade de água ou gás natural com o propósito de deslocar o óleo para fora dos

poros da rocha de forma mecânica, sem interação química ou termodinâmica entre os fluidos ou entre os fluidos e a rocha (FENIBO *et al*, 2019).

Já a Recuperação Avançada de Petróleo, ou Recuperação Terciária, acontece quando a recuperação secundária não foi eficiente para a extração de petróleo. São métodos mais sofisticados, envolvendo processos químicos e térmicos, baseados nas características particulares de cada reservatório. Nessa situação, ocorre a injeção de fluidos que sejam miscíveis e que reajam quimicamente com o óleo do reservatório, diminuindo as tensões interfaciais entre eles. As moléculas surfactantes são utilizadas sob diversas maneiras, tanto em solução através da Injeção de Solução de Tensoativos, formada por uma mistura de polissacarídeos e tensoativos ou na forma de espumas para controlar a molhabilidade (FENIBO *et al*, 2019; MAYER *et al*, 2000; THOMAS, 2004).

Os surfactantes têm duas rotas de produção distintas: sintética ou biológica. Os sintéticos são derivados de hidrocarbonetos do petróleo, o que aumenta sua toxicidade quando disseminados em ambientes aquáticos e terrestres e em alguns casos, para seres humanos (NITSCHKE & PASTORE, 2002; THOMAS 2004). Como é amplamente utilizado em diversos processos industriais e domésticos, o seu descarte provoca danos ambientais alarmantes, como presença de surfactantes nos corpos hídricos que reduz a tensão superficial da água e a sua taxa de evaporação, aumentando a solubilidade de compostos orgânicos presentes nos corpos hídricos e favorecendo o fenômeno bioquímico de eutrofização. A espuma formada sobre a superfície da água diminui a penetração dos raios solares, reduz a solubilidade do oxigênio provocando a morte de micro-organismos, peixes e plantas aquáticas (GUEDES, 2010). Com isso, é proposta a substituição dos surfactantes químicos por produtos análogos naturais, cuja origem pode ser animal, vegetal, enzimática e sobretudo microbiana, uma vez que estes últimos apresentam propriedades similares ou mesmo melhores daqueles sintetizados por rotas químicas.

2.2. Biosurfactantes

Devido ao potencial poluidor e tóxico dos surfactantes sinteticamente produzidos, desde os anos 1990 buscam-se alternativas de síntese da molécula a partir de tecnologias mais limpas e ambientalmente benéficas. Sob essa ótica, os biosurfactantes são alternativas biodegradáveis ao quimicamente sintetizados, representando uma molécula anfipática de origem microbiana, vegetal ou animal. Das possibilidades de obtenção de biosurfactantes,

as bactérias são os microrganismos mais explorados para a produção dos mesmos ((NITSCHKE & PASTORE, 2002; OTZEN, 2017).

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas com propriedades semelhantes e muitas vezes superiores aos surfactantes. A região hidrofóbica pode ser estruturada a partir de hidrocarbonetos ou ácidos graxos, que podem estar em formas saturada ou insaturada, hidroxilados ou ramificados (NITSCHKE & PASTORE, 2002). A estrutura hidrofílica é geralmente constituída de aminoácidos, peptídeos ou polissacarídeos (DRAKONTIS, 2020).

Ao contrário dos surfactantes sintetizados quimicamente, classificados de acordo com o grupamento polar da cabeça hidrofílica, os biossurfactantes são categorizados de acordo com a sua composição química, peso molecular e pela origem biológica. Na classificação de acordo com o seu peso molecular, os biossurfactantes de alto peso têm grande parte de sua estrutura formada por polissacarídeos, proteínas e lipoproteínas, e os de baixo peso molecular formam-se a partir de fosfolipídios e ácidos graxos, glicolipídios e lipopeptídeos ((NITSCHKE & PASTORE, 2002; TADROS, 2014).

A classificação de acordo com a composição química apresenta as seguintes classes: os glicolipídios, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, biossurfactantes poliméricos e biossurfactantes particulados (NITSCHKE & PASTORE, 2002). A origem do biossurfactante é o fator que determina a sua composição química, o arranjo estrutural e as principais propriedades físico-químicas (DRAKONTIS, 2020; NITSCHKE & PASTORE, 2002; OTZEN, 2017).

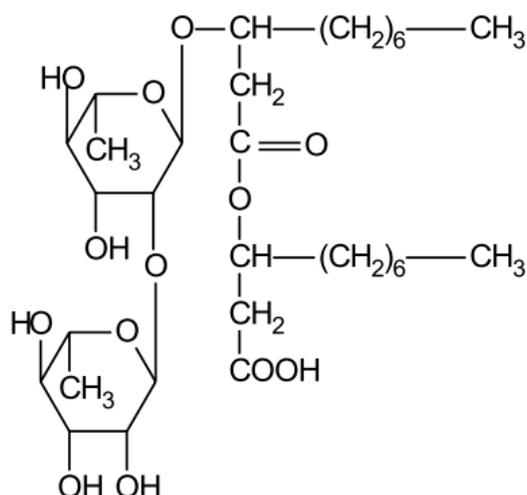
Os biossurfactantes de origem vegetal, conhecidos como Saponinas, são combinações químicas entre glicose e esteroides ou de terpenos policíclicos, que são produtos do metabolismo secundário de algumas espécies de plantas (NITSCHKE & PASTORE, 2002). Como molécula tensoativa, tem uma parte de sua estrutura com característica lipofílica, com moléculas de triterpeno ou esteroide, e outra hidrofílica, com carboidratos (SCHENKEL *et al.*, 2001). Possuem caráter ácido devido à presença de grupamento carboxila no glicosídeo ou na cadeia de açúcares e, em contato com as células eucariontes, tem interação com as bicamadas de proteína e lipídeo que circundam a célula. As moléculas saponinas podem ser encontradas em leguminosas, na acelga e em determinados tipos de chás, como o de Gingseng (WINA, 2005).

Os biossurfactantes de origem microbiana receberam um intenso interesse da indústria devido a sua ampla aplicabilidade, resultado de suas propriedades físico-químicas (FENIBO *et al.*, 2019). Como as células de microrganismos, fungos e bactérias, possuem uma estrutura celular menos complexa e constantemente estudada, são desenvolvidas diversas estratégias

de processo afim de aumentar a produtividade desse tipo de biossurfactante, que podem ir desde manipulação genética de linhagens novas, produção recombinante e estudos de otimização a partir de novos nutrientes ou condições de reprodução. São aplicados em diversos processos, como na biorremediação de incidentes ambientais, recuperação terciária do petróleo, aditivos em alimentos, fármacos, tintas, produtos de limpeza e cosméticos (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Os Ramnolipídios são uma classe desses biossurfactantes, sintetizados pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* que produz até seis tipos de Ramnolipídeos e possuem estrutura química e atividade superficial semelhantes. Esse composto, por exemplo, é amplamente utilizado na redução da tensão superficial da água de 72 N.m⁻¹ para 30 N.m⁻¹. (FENIBO *et al*, 2019; NITSCHKE & PASTORE, 2002). A Figura 2.4. representa a estrutura química de um Ramnolipídio.

Figura 2.4. Estrutura Química do Biossurfactante Ramnolipídeo



Fonte: Adaptado de Nitschke & Pastore (2002).

O Quadro 2.2. abaixo contém um resumo das principais classes de Biossurfactantes, assim como os principais microrganismos que os sintetizam.

Quadro 2.2. Classificação dos Biossurfactantes e os principais microrganismos

Classificação do Biossurfactante	Subclassificação do Biossurfactante	Microrganismo
Glicolipídios	Ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Glicolipídios	Soforolipídeos	<i>Torulopsis bambicola</i>
Glicolipídios	Trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	Peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	Surfactina	<i>Serratia marcescens</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	Gramicidina	<i>Bacillus polymixa</i>
Ácidos graxos, lipídios e fosfolipídios	Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Ácidos graxos, lipídios e fosfolipídios	Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Ácidos graxos, lipídios e fosfolipídios	Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Surfactantes poliméricos	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Surfactantes poliméricos	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Surfactantes particulados	Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

Fonte: Adaptado de Nitschke & Pastore, 2002.

A classificação de acordo com o peso molecular é feita em duas subclasses, os biossurfactantes de alto peso molecular e os de baixo peso molecular (SANTA ANNA, 2002). Os de alto peso molecular são produzidos por bactérias de alta seletividade, formados por polissacarídeos anfipáticos, proteínas, lipopolissacarídeos e lipoproteínas. São menos eficazes na redução da tensão interfacial e mais eficazes na estabilização de emulsões óleo/água. Já os biossurfactantes de baixo peso molecular têm maior superfície de contato, mesmo com uma estrutura química mais simples (NITSCHKE & PASTORE, 2002). São principalmente moléculas de glicolipídios, lipopeptídeos, tanto os cíclicos quanto os

acíclicos, e os fosfolipídios. Tais moléculas são utilizadas em situações em que se é necessário a redução das tensões superficial e interfacial.

Os biossurfactantes podem ser produzidos em diversas etapas celulares, ocorrendo tanto na porção intracelular quanto na extracelular, além de ser os principais componentes da parede celular (ESTOPA, 2018). Algumas células microbianas têm capacidade emulsificante devido a sua alta hidrofobicidade e assim, comportam-se como um biossurfactante. Como exemplo desses microrganismos podem-se citar algumas espécies de *Cyanobactérias*, algumas bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus* e *Serratia marcescens*, além de alguns microrganismos degradadores de hidrocarbonetos. As vesículas e células microbianas com atividade surfactante são biossurfactantes particulados (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

A diversidade estrutural, função da espécie microbiana e das condições de cultivo empregadas, aliada à elevada eficácia em ampla faixa de pH, temperatura e salinidade permitem que os biossurfactantes apresentem propriedades similares aos químicos (MAYER, 2000; MUHAMMAD, 2018; NITSCHKE & PASTORE, 2002). Dessa forma, existe a possibilidade dos biossurfactante serem aplicados quando os surfactantes químicos têm pouca eficácia, como por exemplo na recuperação terciária de petróleo, posto que a maioria destes últimos não é estável em condições extremas (GUDIÑA, 2012). Além desse caso, muitas das características do biossurfactante são vantajosas em comparação aos quimicamente sintetizados.

- Maior atividade superficial e interfacial: Os biossurfactantes tem maior efetividade e eficiência em comparação aos surfactantes convencionais, por possuírem menor CMC, são mais eficientes para a diminuição da tensão superficial e interfacial, mesmo em menores concentrações (GUDIÑA, 2012; NITSCHKE & PASTORE, 2002).

- Maior tolerância às condições extremas de temperatura, pH, salinidade e força iônica: Alguns biossurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica e de pH podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas. Como exemplo têm-se o lipopeptídeos de *B. licheniformis* que mantém a sua estabilidade em temperaturas acima de 75°C com exposições superiores a 140 horas. Em condições de salinidade, os biossurfactantes suportam concentrações de 10% de NaCl enquanto os surfactantes convencionais se inativam a uma concentração a de 2-3% (DECESARO, 2013; NITSCHKE & PASTORE, 2002).

- Biodegradabilidade: Devido à produção dos biossurfactantes ocorrer por meios metabólicos de microrganismos, têm maior índice de degradação na água e no solo. Essa

característica os torna recomendados para aplicações em biorremediação e no tratamento de resíduos (NITSCHKE & PASTORE, 2002; OTZEN, 2017).

- Baixa toxicidade: os biossurfactantes têm menor índice de efeitos alérgicos, o que permite o uso em alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

2.3. Bactérias *Pseudomonas*

As bactérias *Pseudomonas* são um gênero de bactérias de forma bacilar e podem ser encontradas em ambientes terrestres ou aquáticos, o que as classifica como ubíquas e são também, gram-negativas. As bactérias Gram-negativas são classificadas dessa maneira a partir do teste de coloração de Gram, que foi realizado pela primeira vez em 1884, por Hans Christian Gram (MOLLINEDO *et al*, 2014). O teste utiliza de um contraste de coloração, que caracteriza bactérias com base na espessura da parede celular peptidoglicana, formada por proteínas e açúcares. As bactérias gram-positivas têm uma camada peptidoglicana espessa, que pode variar de 20 a 80 nm. Já nas gram-negativas, a camada peptidoglicana é mais fina, em torno de 8 nm (MOLLINEDO *et al*, 2014). Devido à diferença de espessura da parede celular, as gram-negativas não retêm o corante violeta de genciana, tornando-se rosa ou vermelhas no microscópio (MOLLINEDO *et al*, 2014). Na Figura 2.5. abaixo, é possível observar a forma bacilar da bactéria *P. aeruginosa*, além de sua coloração rosada no teste de Gram, utilizando um microscópio ótico e aumento de 100x.

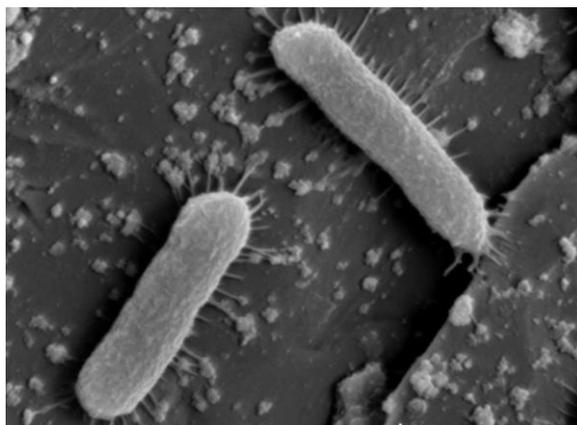
Figura 2.5. Bactéria *Pseudomonas P. aeruginosa* em teste colorimétrico de Gram, utilizando microscópio ótico com aumento de 100x.



Fonte: Adaptado de Mohammad (2016).

A bactéria *P. aeruginosa* é anaeróbia facultativa e tem condições de proliferação em condições independentes da quantidade total de oxigênio disponível, realizando tanto fermentação quanto respiração para obter energia. Dessa forma, em um ambiente com oxigênio, é capaz de realizar respiração e em ambiente anaeróbico, pode atingir o crescimento anaeróbico com nitrato ou nitrito como aceptor de elétrons terminais. Já a bactéria *Pseudomona fluorescens* é bacilar multi-flagelada, sendo que a maioria das suas cepas são aeróbias obrigatórias (MAYER, 2000). Através da Figura 2.6. abaixo, é possível identificar a forma bacilar da *P. fluorescens* e seus múltiplos flagelos.

Figura 2.6. Bactéria *Pseudomona P. fluorescens* em microscópio ótico com aumento de 500x.



Fonte: Adaptado de Sillankorva et al (2008).

Na presença de oxigênio, as *Pseudomonas* realizam um processo conhecido como respiração aeróbica celular, que pode ser dividida em três etapas interdependentes: a glicólise, o ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa (MAYER, 2000). A glicólise é a primeira etapa e ocorre de forma anaeróbica no citoplasma da célula, realizando a quebra da glicose em duas moléculas de ácido pirúvico, através da adição de fosfatos à molécula de glicose. Essa quebra tem como produto duas moléculas de adenosina tri-fosfato (ATP), a liberação de quatro elétrons e quatro íons de Hidrogênios Ionizáveis, conhecidos como hidrônio (H^+). Ao final da reação, os dois H^+ e os quatro elétrons são capturados por duas moléculas de NAD^+ (Dinucleotídio de Nicotinamida-adenina), que se torna NADH quando está oxidado. Essa primeira etapa é semelhante tanto na respiração aeróbica, quanto na anaeróbica, de forma que na última essa é a única etapa para formação de ATP (LEHNINGER, 2017).

O ATP é um nucleotídeo que funciona como intermediário químico e conecta os processos celulares que liberam energia com os que consomem energia, sendo formado por

uma molécula de carboidrato ribose, uma base nitrogenada adenina e três radicais de fosfato. O NADH é um cofator carregador de elétrons que capta elétrons de reações oxidativas e libera a partir de reações de redução. Esses “auxiliares” são cofatores essenciais às reações anabólicas e de sobrevivência de uma célula, estando presente nos processos construtores anabólicos e nos destrutivos, os catabólicos, que ocorrem a partir da hidrólise (LEHNINGER, 2017).

A segunda parte é o ciclo de Krebs, que se desenvolve no interior da mitocôndria, na matriz mitocondrial. Esse processo inicia-se quando o ácido pirúvico reage com a coenzima A, formando uma molécula de acetil-CoA (Acetilcoenzima A) e uma molécula de dióxido de carbono (CO₂). As moléculas de acetil-CoA sofrem então oxidação a partir do ácido oxalacético e, ao final, formam-se uma coenzima A intacta e duas moléculas de CO₂, além de ácido cítrico. No final do processo, o ácido oxalacético é recuperado e pode ser reciclado na próxima cadeia respiratória. Os elétrons e os íons formados são capturados pelo NAD⁺ ou Dinucleótido de Flavina e Adenina (FAD), formando respectivamente NADGH ou FADH₂. Ao final do ciclo, encontram-se formados 3 NADH e 1 FADH₂ que atuam como transmissores de elétrons ao longo da respiração (LEHNINGER, 2017; ULLMANN, 2019).

Por fim, no processo de Fosforilação oxidativa, ocorre a reoxidação das moléculas de NADH e FADH₂, sendo liberada uma grande quantidade de elétrons, que formam água. Durante a formação de água, energia vai sendo liberada e usada na produção de ATP. A fosforilação oxidativa é responsável pela maior parte do ATP produzido pela célula (LEHNINGER, 2017).

O processo de respiração celular é uma estratégia de sobrevivência dos microrganismos, possibilitando a sobrevivência da espécie na competição por nutrientes. Através da energia obtida pelas moléculas de ATP a célula tem capacidade de manter suas atividades, crescer e se multiplicar (SANTIAGO, 2019). Além da obtenção de energia, somam-se a habilidade da célula de bactéria de utilizar os biossurfactantes ligados à parede para regular as propriedades da superfície celular, visando aderir ou se desligar de um determinado local de acordo com sua necessidade para encontrar novos habitats com maior disponibilidade de nutrientes ou se livrar de ambientes desfavoráveis., como exemplo pode-se citar os Ramnolipídios da *P. aeruginosa* e a surfactina da *Bacillus subtilis* funcionam como antibióticos, solubilizando os principais componentes das membranas celulares, entrando como microrganismo oportunista na célula hospedeira (NITSCHKE & PASTORE, 2002; SANTIAGO, 2019).

2.4. Cinética química de produção de Biosurfactantes

A taxa de crescimento de microrganismos, no caso das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*, pode ser descrita em função de diversos parâmetros. Para descrever esse fenômeno, Jacques Monod se baseou no trabalho de Michaelis e Menten, que tratava dos estudos de cinética enzimática, e na relação não linear entre crescimento microbiano e concentração de substrato, que implica que a taxa de crescimento específico da concentração microbiana é dada em função da concentração do substrato limitante e da constante de saturação (LEHNINGER, 2017; SAKTHPRIYA, 2015). O modelo de Monod é largamente utilizado, porém não leva em consideração o efeito de inibidores tanto pelo substrato quanto o produto, além de descrever o crescimento de bactérias em função da concentração de um único substrato limitante. Para dimensionar esse crescimento cinético, que ocorre quando as células têm energia e nutrientes suficientes para manter todas as funções vitais e ter capacidade de crescimento e multiplicação, é necessário criar um meio de cultura com todas as condições adequadas e suficientes (LEHNINGER, 2017).

Para exemplificar, quando uma célula é inoculada num determinado instante inicial, t_0 , se as condições forem favoráveis ela irá se desenvolver nesse meio até que atinja a maturidade necessária para se reproduzir e dessa forma, ao se dividir dará origem a duas novas células. Esse instante pode ser representado pela variável t_d , simbolizando o tempo de duplicação (LEHNINGER, 2017). Supondo que as condições ideais sejam mantidas, as células filhas continuarão se duplicando sucessivamente e ao fim de um tempo t determinado haverá N gerações de bactérias. A partir do equacionamento dessas variáveis, chega-se à Equação 1 abaixo que relaciona o número de gerações com o tempo de duplicação da célula.

$$N = N_0 2^{(t-t_0)} \quad (1)$$

Em que:

N: Gerações de células;

t: Tempo (h);

N_0 : Geração inicial de células.

Para que os cálculos se tornem mais abrangentes, supondo que a célula não necessariamente duplica, utiliza-se a base “e” neperiana (LEHNINGER, 2017). Dessa

forma, a equação de modelagem para o crescimento se torna a Equação 2, para o mesmo instante e tempo. Além do neperiano, pode-se incluir a taxa específica de crescimento, que se relaciona com o tempo de duplicação do organismo através da Equação 3.

$$N = N_0 e^{\mu(t-t_0)} \quad (2)$$

$$\mu = \frac{\ln(N)}{t_d} \quad (3)$$

Em que:

μ : Velocidade específica de crescimento (h^{-1});

t_d : Tempo de duplicação da célula (h).

A taxa de produção de biomassa em função da taxa de crescimento celular é definida pela Equação 4 abaixo (LEHNINGER, 2017).

$$r_X = \mu X \quad (4)$$

Onde:

X é a massa seca de biomassa (g);

r_X : Taxa específica de crescimento (h^{-1});

Considerando que o crescimento ocorre em um reator descontínuo (sem qualquer fluxo de entrada e de saída), a concentração de biomassa varia apenas devido ao crescimento das células e considerando-se que ocorre uma mistura perfeita, o balanço de massa é simples e é utilizado para quantificar o crescimento celular das bactérias ao longo do tempo (LEHNINGER, 2017). Dessa forma, através da uma equação diferencial ordinária, Equação 5, expressa abaixo:

$$\frac{dX}{dt} = r_X = \mu X \quad (5)$$

A partir da resolução da Equação Diferencial acima, utilizando a condição inicial de $X=X_0$ e $t=t_0$ (LEHNINGER, 2017), a Equação 6 fica da seguinte forma:

$$\ln X - \ln X_0 = \mu(t - t_0) \quad (6)$$

A velocidade específica de crescimento depende de variáveis ambientais, como temperatura, pH, pressão e salinidade, além da disposição de nutrientes e substratos disponíveis (SAKTHPRIYA, 2015). Para a determinação desse fator, Monod descreveu um modelo matemático que relaciona a velocidade específica de crescimento com a concentração de substrato limitante, mantendo constante as outras variáveis (LEHNINGER, 2017; SAKTHPRIYA, 2015). Dessa forma, a Equação de Monod é representada pela Equação 7 abaixo:

$$\mu = \mu_{max} \frac{[S]}{K_S + [S]} \quad (7)$$

Onde:

K_S : Constante de Monod, cujo valor é igual à concentração de substrato, $[S]$ para a qual $\mu = \frac{1}{2}\mu_{max}$.

μ_{max} : Velocidade específica máxima de crescimento que se poderia observar quando $[S] \rightarrow \infty$.

De acordo com Monod (1949), o crescimento celular pode ser descrito através de um ciclo de vida caracterizado por uma série sucessiva de etapas caracterizadas por diferentes taxas de crescimento (LEHNINGER, 2017). As etapas definidas por Monod para um processo descontínuo em batelada e suas taxas de crescimento estão descritas no Quadro 2.3. abaixo.

Quadro 2.3. Descrição das Fases do crescimento celular, descritas através da cinética de Monod

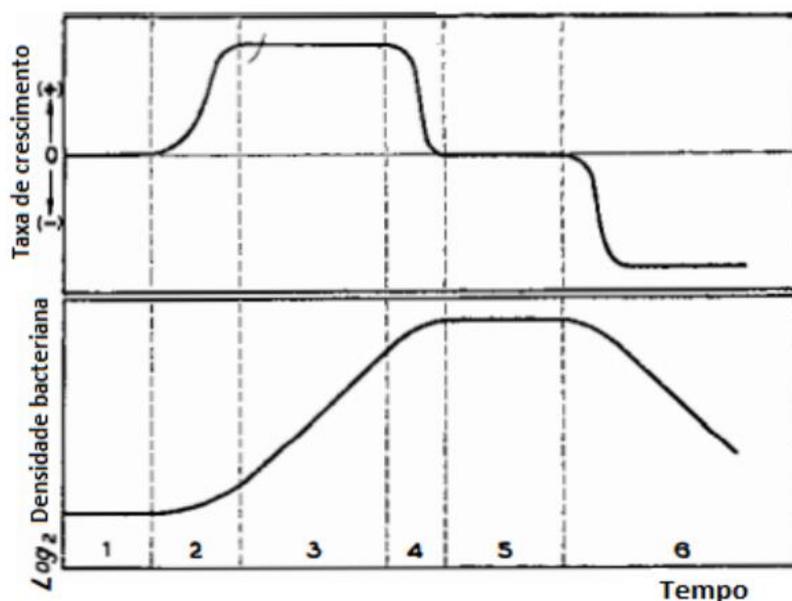
Fase de crescimento	Caracterização
Fase 1 – Fase de Latência ou Fase LAG	Adaptação dos microrganismos ao meio celular, caracterizado pela ausência de crescimento e manutenção do número de células.
Fase 2 - Fase de aceleração	Etapa de intensa atividade metabólica, ocasionando aumento da taxa de crescimento microbiano.
Fase 3 - Fase exponencial ou Fase LOG	Caracterizado pela taxa de metabolismo em condições máximas e constantes.

Fase 4 - Fase de retardo	Após a Fase LOG, o meio de cultura atinge a quantidade máxima de células, limitando o substrato e ocasionando uma diminuição da taxa de crescimento.
Fase 5 - Fase estacionária	Durante essa fase, a taxa de crescimento celular é novamente nula devido ao consumo do substrato e consequente limitação dos nutrientes.
Fase 6 - Fase de declínio	Se inicia a partir de uma taxa de crescimento negativa, com a morte dos microrganismos no meio de cultura.

Fonte: Adaptado de Lehninger, 2017.

A taxa de crescimento microbiano se altera caso os nutrientes no meio forem exauridos, produtos inibidores se acumulem ou o equilíbrio iônico do meio (e com ele, o pH) se altere devido às reações bioquímicas (LEHNINGER, 2017). Na Figura 2.7. é possível ver graficamente as fases do crescimento celular, a partir da taxa de crescimento celular e do logaritmo da densidade bacteriana ao longo do tempo.

Figura 2.7. Representação das taxas de crescimento microbiano e da densidade microbiana em cada etapa do Crescimento celular



Fonte: Adaptado de Lehninger (2017).

Para os processos em que um produto do metabolismo microbiano é o composto de interesse os metabólitos podem ser classificados em duas subcategorias:

- Metabólitos primários: são produzidos durante a fase de crescimento exponencial do microrganismo. Sendo assim, o crescimento ocorre durante a produção de energia, a

produção de metabólico está associada ao crescimento. Os biossurfactantes Ramnolipídios são caracterizados dessa forma.

- Metabólitos secundários: são sintetizados durante a fase estacionária de crescimento, de forma que a produção não se associa ao crescimento celular.

2.5. Produção comercial de biossurfactantes

A produção industrial de biossurfactantes encontra diversos empecilhos à medida que os parâmetros do processo são muito sensíveis e qualquer alteração nas variáveis acarreta alterações nas propriedades do produto final. Os principais fatores que necessitam ser modelados referem-se a fonte de carbono utilizada como substrato, à aeração e agitação dos biorreatores, a temperatura e o pH do meio (ESTOPA, 2018).

A síntese dos biossurfactantes, analisada em um meio de cultura, ocorre durante a fase de crescimento celular, que pode ser identificada a partir da diminuição da tensão superficial ou interfacial do meio, causando a emulsão de substratos lipofílicos no caldo da cultura (MESQUITA, 2004).

Para a cinética de produção de uma molécula de biossurfactante, alguns parâmetros cinéticos são determinados a partir de técnicas associadas ao crescimento e produção, evitando as condições limitantes de crescimento. A extração e purificação pode ser considerada uma etapa crítica, quando ocorre o envenenamento ou morte dos organismos durante esse processo. Um dos métodos é o de precipitação ácida, que ocorre para biossurfactantes insolúveis em pH baixos e tem baixo custo de operação (MESQUITA, 2004; SAKTHPRIYA, 2015). Outro processo é a precipitação a partir da adição de sulfato de amônio, que tem como foco os biossurfactantes que apresentam maior quantidade de proteínas. A precipitação com acetona ou etanol e a extração com solventes orgânicos, funcionam para os biossurfactantes solúveis em solventes orgânicos (ESTOPA, 2018).

2.6. Aplicação de biossurfactantes

A aplicação de biossurfactantes nos mais diversos setores ambiental e industrial tem conferido grande destaque para essas moléculas, com a indústria petroquímica como maior mercado, sendo utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes (MESQUITA, 2004). Outras aplicações incluem biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, utilização em produtos cosméticos e de higiene pessoal, na indústria de alimentos (MULLIGAN, 2005; OTZEN, 2017).

Nas atividades de biorremediação, os tensoativos de origem microbiana aceleram a degradação natural de substâncias poluentes, em locais que sofreram acidentes químicos envolvendo contaminação de solos e/ou ambientes aquáticos (DECESARO, 2013; NITSCHKE & PASTORE, 2002; SAKTHPRIYA, 2015). Para que se realizem, são necessários estudos envolvendo a biocompatibilidade e a biodisponibilidade entre os contaminantes e os biossurfactantes (MULLIGAN, 2005). Como exemplo de aplicação pode-se citar os acidentes envolvendo derramamento de óleo em alto mar, que causam muitos problemas ecológicos à fauna marinha e à população que depende da piscicultura para a sobrevivência. Os biossurfactantes aumentam a interação superficial que ocorre entre a água e o óleo, emulsionando-os através da diminuição da tensão superficial de forma a acelerar a degradação de vários óleos, auxiliando no processo de biorremediação (NITSCHKE & PASTORE, 2002). Além da água, os processos de biorremediação podem ocorrer na a estrutura do solo, envolvendo parâmetros como a transferência de massa de água e nutrientes (DECESARO, 2013). Dessa forma, podem ser utilizados para aumentar o índice de absorção de nutrientes pelo solo, ou agir como emulsionantes de contaminantes, facilitando a degradação do mesmo.

Na extração de petróleo se faz uso intensivo de biossurfactantes em diversos estágios do processamento do óleo, de forma semelhante ao que ocorre nos surfactantes de síntese química. Sendo assim, pode ser utilizado durante a injeção de fluidos para a Recuperação Terciária de Petróleo, no tratamento para o entupimento de tubulações com frações pesadas de petróleo e como biorremediação para possíveis vazamentos e acidentes (ESTOPA, 2018).

Na indústria de produtos de higiene são amplamente utilizados devido a sua baixa toxicidade – comparado aos surfactantes usuais -, sendo compatível com a pele e promovendo sensações de hidratação, umectação, além de servirem como a base de

shampoos devido a sua interação com a gordura produzida pelo couro cabeludo, promovendo uma emulsão e facilitando a limpeza dos fios (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Já na indústria alimentícia os biossurfactantes são utilizados na emulsificação de cremes líquidos, auxiliando na formação da consistência e textura e como dispersantes de aromas. O bioemulsificante produzido pela bactéria *Candida utilis* tem sido utilizado em molhos prontos para saladas. Outras aplicações são a panificação e em processos que aumentam a durabilidade de carnes (NITSCHKE & PASTORE, 2002). Como antiespumante pode ser utilizado no processo de fritura de alimentos, evitando a formação de bolhas de ar que podem causar ferimentos nos operadores e danificar equipamentos através da incrustação de gordura (ESTOPA, 2018)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização da Simulação Dinâmica da produção de biossurfactantes a partir do metabolismo celular das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens* foi utilizado o Software SciLab® 6.1.1 para Windows, que é um software gratuito e de código aberto para engenheiros e cientistas e possui interface gráfica versátil e simplificada para o controle de variáveis.

O SciLab® contém rotinas de programação para a solução numérica de problemas de álgebra linear, determinação de raízes de equações não-lineares, integração de equações diferenciais ordinárias e equações diferenciais algébricas. Para a modelagem do crescimento cinético das bactérias analisadas, foram utilizadas as Equações Diferenciais Ordinárias, que são dimensionadas a partir da entrada e saída de dados em uma matriz, utilizando-se dos parâmetros experimentais obtidos no artigo de Sakthpriya *et al* (2015). Dessa forma, a partir dos parâmetros cinéticos foi gerada uma rotina de simulação para a produção cinética de biossurfactantes por meio do consumo de frações pesadas de petróleo (n-Eicosano e n-Hexadecano).

3.1. Procedimento de Cálculo

A partir de equações diferenciais ordinárias que descrevem o crescimento celular das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*, modeladas a partir do modelo cinético propostos por Monod, realizou-se a simulação do crescimento celular, apoiado no consumo das frações pesadas de petróleo como substrato, na formação de biossurfactante como produto desejado e no rendimento teórico obtido. O modelo cinético e os respectivos parâmetros, bem como as condições iniciais usadas, são apresentados a seguir. Para expressar essas variáveis, utilizam-se os seguintes subíndices de modo a facilitar a descrição das mesmas ao longo das equações:

X: Concentração de bactérias *Pseudomonas* no tempo t (g.L^{-1});

S: Concentração de Substrato de parafina no tempo t (g.L^{-1});

P: Concentração de biossurfactante no tempo t (g.L^{-1}).

3.1.1. Modelo cinético de Monod

A cinética reacional de Monod é determinada em função de variáveis como taxa específica de crescimento da célula do microrganismo, do consumo de substrato e a formação de biossurfactantes, como produto metabólico.

Partindo da equação de Monod (na Equação 7) são desenvolvidas as Equações 8 e 9, que representam a variação da quantidade de substrato de parafina (consumo de n-Eicosano e n-Hexadecano) e a formação de produto ao longo do tempo do experimento.

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} \quad (8)$$

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \frac{dX}{dt} \quad (9)$$

Em que:

$Y_{X/S}$: Rendimento calculado a partir da biomassa média produzida por unidade de massa de substrato consumido ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$);

$Y_{P/X}$: Rendimento calculado a partir da quantidade de biossurfactante produzido por unidade de massa de biomassa consumida ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$);

A quantidade de Ramnolipídio produzido (produto) pode ser escrita em função do rendimento, calculado tanto em função da quantidade de substrato consumido quanto da quantidade de biomassa. Para quantificar o rendimento do produto, relacionam-se as equações 10 abaixo. Na equação 11 encontra-se a relação que existe entre as variáveis relativas aos rendimentos, cada um calculado de acordo os parâmetros de interesse, sejam esses relacionados ao produto ou células de bactérias formados ou ao substrato consumido. O subscrito 0 nessas variáveis indica o seu valor no tempo inicial do experimento.

$$P - P_0 = Y_{P/S}(S_0 - S) \quad (10)$$

$$Y_{X/S} = Y_{P/S}/Y_{P/X} \quad (11)$$

Em que:

$Y_{P/S}$: Rendimento calculado a partir da quantidade de biossurfactante produzido em função da massa de substrato consumido (g.g^{-1}).

Por fim, é possível escrever as equações diferenciais para determinar a produção de produto e o consumo de biomassa e substrato, inicialmente manipuladas a partir da Equação de Monod descrita pela Equação 7. As Equações 12 a 14 utilizam a constante de saturação de Monod, a velocidade máxima de crescimento celular e os rendimentos reacionais como variáveis.

A variação de biomassa é feita a partir da EDO expressa abaixo pela Equação 12, que correlaciona variáveis como a concentração de Substrato, a Constante de Monod e a concentração de biomassa:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_S + S} X \quad (12)$$

A variação de substrato de frações pesadas de petróleo é descrita a partir da EDO, que correlaciona a concentração de biomassa, a constante de Monod e o rendimento da equação baseada na produção de biomassa a partir do consumo de substrato. Essa relação pode ser visualizada na Equação 13:

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_S + S} X \quad (13)$$

Por fim, a produção de Biossurfactante é dada pela Equação Diferencial 14 abaixo, que utiliza variáveis como a Constante de Monod, o rendimento de produto dado a partir da biomassa e a concentração de substrato:

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_S + S} X \quad (14)$$

K_S : Constante de saturação de Monod (g.L^{-1})

3.1.1.1. Parâmetros – Baixo Rendimento

Para a realização da simulação do crescimento celular utilizando o Modelo de Monod foram utilizados os parâmetros cinéticos descritos por Sakthparya *et al* (2015), através de uma rotina de simulação do crescimento celular, consumo das duas frações pesadas de parafina (n-Hexadecano e n-Eicosano) e da produção de biossurfactante.

Para o desenvolvimento das equações diferenciais e das rotinas de simulação foram variados os parâmetros de acordo com os dois substratos utilizados, as duas bactérias *Pseudomonas* e os parâmetros de rendimento calculados a partir da quantidade de biossurfactante produzido por unidade de massa de biomassa consumida ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), totalizando um total de quatro rotinas para a cinética de Monod com baixo rendimento e quatro rotinas para a cinética de Monod de alto rendimento. As tabelas dispostas abaixo contêm os valores dos parâmetros apresentados nas equações 12 a 14 explicitadas acima, para cada uma das quatro variações de baixo rendimento.

A Tabela 3.1. contém os parâmetros, os valores quantitativos e as unidades utilizados para a simulação da cinética química a partir de *P. aeruginosa* como microrganismo, n-Hexadecano como substrato e o $Y_{P/X}$ de baixo rendimento.

Tabela 3.1. Parâmetros cinéticos de Monod de Baixo Rendimento – *P. aeruginosa* e n-Hexadecano.

Parâmetro	Valor	Unidade
K_s	3,40	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
$Y_{P/S}$	1,10	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
$Y_{P/X}$	0,15	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
$Y_{X/S}$	0,12	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
μ_{\max}	0,50	h^{-1}

Fonte: Adaptado de SAKTHPRIYA *et al* (2015).

A Tabela 3.2. contém os parâmetros utilizados na simulação a partir de *P. fluorescens* como microrganismo, n-Hexadecano como substrato e o $Y_{P/X}$ de baixo rendimento.

Tabela 3.2. Parâmetros cinéticos de Monod de Baixo Rendimento – *P. fluorescens* e n-Hexadecano.

Parâmetro	Valor	Unidade
Ks	8,80	g.L^{-1}
Y_{P/S}	0,05	g.g^{-1}
Y_{P/X}	0,13	g.g^{-1}
Y_{X/S}	0,20	g.g^{-1}
μ_{max}	1,90	h^{-1}

Fonte: Adaptado de SAKTHPRIYA *et al* (2015).

A Tabela 3.3. contém os parâmetros utilizados a partir de *P. aeruginosa* como microrganismo, n-Eicosano como substrato e o Y_{P/X} de baixo rendimento.

Tabela 3.3. Parâmetros cinéticos de Monod de Baixo Rendimento – *P. aeruginosa* e n-Eicosano.

Parâmetro	Valor	Unidade
Ks	7,20	g.L^{-1}
Y_{P/S}	0,09	g.g^{-1}
Y_{P/X}	0,35	g.g^{-1}
Y_{X/S}	0,41	g.g^{-1}
μ_{max}	0,09	h^{-1}

Fonte: Adaptado de SAKTHPRIYA *et al* (2015).

Por fim, a Tabela 3.4. discrimina os parâmetros utilizados na simulação cinética de Monod, utilizando a bactéria *P. fluorescens* como biomassa, n-Eicosano como substrato e o Y_{P/X} de baixo rendimento.

Tabela 3.4. Parâmetros cinéticos de Monod de Baixo Rendimento – *P. fluorescens* e n-Eicosano.

Parâmetro	Valor	Unidade
Ks	8,90	g.L^{-1}
Y_{P/S}	0,67	g.g^{-1}
Y_{P/X}	0,25	g.g^{-1}
Y_{X/S}	0,53	g.g^{-1}
μ_{max}	0,24	h^{-1}

Fonte: Adaptado de SAKTHPRIYA *et al* (2015).

Foi utilizado um sistema de equações diferenciais ordinárias (EDOs) baseado nas Equações 12, 13 e 14, implementado no ambiente Scilab®. Para a resolução utilizou-se a função “ode”, que é a função padrão para se resolver sistemas de EDO definidos como Problemas de Valor inicial (PVI), onde a equação é definida por $dy/dt=f(t,y)$ com condições iniciais, $y(t_0)=y_0$. Além dessa função, utilizou-se o solucionador para problemas rígidos, o “stiff”, que faz parte do pacote ODEPACK e é chamado e utilizado o método FDR, ou seja, a Fórmula de Diferenciação Retroativa (FDR) para problemas rígidos, além do solucionador adaptado para Runge-Kutta de ordem 4 (RK4). As condições iniciais utilizadas na resolução do problema PVI composto pelas Equações 12, 13 e 14 estão dispostos na Tabela 3.5.. As quatro rotinas implementadas a partir da variação do valor dos parâmetros são expostas no Apêndice A.

Tabela 3.5. Parâmetros Iniciais utilizados nas Simulações a partir do modelo de Monod de Baixo Rendimento.

Parâmetro	Valor	Unidade
S₀	1	(g.L ⁻¹)
X₀	0,01	(g.L ⁻¹)
P₀	0	(g.L ⁻¹)

Fonte: Adaptado de SAKTHPRIYA *et al* (2015).

3.1.2.1. Parâmetros – Alto rendimento

De forma semelhante a simulação do crescimento celular utilizando o Modelo de Monod, foram utilizados os parâmetros cinéticos descritos por Sakthpuryia *et. al* (2015) para a realização da Simulação, variando a quantidade de biossurfactante produzido por unidade de massa de biomassa consumida (g.g⁻¹), dessa vez os valores atribuídos ao alto rendimento. Através de uma rotina foi determinado o crescimento celular, o consumo das duas frações pesadas de parafina (n-Hexadecano e n-Eicosano) e da produção de biossurfactante.

O desenvolvimento das equações diferenciais e das rotinas de simulação foram feitos a partir da variação dos parâmetros de acordo com os dois substratos utilizados e as duas bactérias *Pseudomonas*, totalizando um total de quatro rotinas para a cinética de alto

rendimento. Nas tabelas abaixo estão dispostos os valores dos parâmetros apresentados nas Equações 12 a 14 explicitadas acima, para cada uma das quatro variações.

A Tabela 3.6. contém os parâmetros, os valores quantitativos e as unidades utilizados para a simulação da cinética química de Monod a partir de *P. aeruginosa* como microrganismo, n-Hexadecano como substrato e o $Y_{P/X}$ de alto rendimento.

Tabela 3.6. Parâmetros cinéticos de Monod de Alto Rendimento – *P. aeruginosa* e n-Hexadecano.

Parâmetro	Valor	Unidade
Ks	3,40	$g.L^{-1}$
$Y_{P/S}$	5,32	$g.g^{-1}$
$Y_{P/X}$	4,81	$g.g^{-1}$
μ_{max}	0,18	h^{-1}

Fonte: Adaptado de SAKTHPRIYA *et al* (2015).

A Tabela 3.7. contém os parâmetros utilizados a partir de *P. fluorescens* como bactéria, n-Hexadecano como substrato, $Y_{P/X}$ de alto rendimento, a partir da cinética química de Monod.

Tabela 3.7. Parâmetros cinéticos de Monod de Alto Rendimento – *P. fluorescens* e n-Hexadecano.

Parâmetro	Valor	Unidade
Ks	8,80	$g.L^{-1}$
$Y_{P/S}$	4,76	$g.g^{-1}$
$Y_{P/X}$	4,11	$g.g^{-1}$
μ_{max}	0,10	h^{-1}

Fonte: Adaptado de SAKTHPRIYA *et al* (2015).

A Tabela 3.8. contém os parâmetros da cinética química de Monod, calculados a partir de *P. aeruginosa* como microrganismo, n-Eicosano como substrato e o $Y_{P/X}$ de alto rendimento.

Tabela 3.8. Parâmetros cinéticos de Monod de Alto Rendimento – *P. aeruginosa* e n-Eicosano.

Parâmetro	Valor	Unidade
K_s	7,20	g.L ⁻¹
Y_{P/S}	3,37	g.g ⁻¹
Y_{P/X}	3,45	g.g ⁻¹
μ_{max}	0,08	h ⁻¹

Fonte: Adaptado de SAKTHPRIYA *et al* (2015).

Por fim, a Tabela 3.9. discrimina os parâmetros utilizados na simulação cinética de Monod, utilizando a bactéria *P. fluorescens* como biomassa, n-Eicosano como substrato e o Y_{P/X} de alto rendimento.

Tabela 3.9. Parâmetros cinéticos de Monod de Alto Rendimento – *P. fluorescens* e n-Eicosano.

Parâmetro	Valor	Unidade
K_s	8,90	g.L ⁻¹
Y_{P/S}	4,51	g.g ⁻¹
Y_{P/X}	3,71	g.g ⁻¹
μ_{max}	0,16	h ⁻¹

Fonte: Adaptado de SAKTHPRIYA *et al* (2015).

Da mesma forma que o esquematizado para os valores de baixo rendimento, o sistema de equações diferenciais ordinárias (EDOs) baseado nas Equações 12, 13 e 14 foi implementado no ambiente Scilab®, utilizando a função “ode” para a resolução dos sistemas de EDO definidos como Problemas de Valor inicial (PVI). Como a simulação se configura como problema rígido, foi utilizado o solucionador para problemas rígidos, o “stiff”, que faz parte do pacote ODEPACK e o método da Fórmula de Diferenciação Retroativa (FDR), junto com o solucionador adaptado para Runge-Kutta de ordem 4 (RK4). As condições iniciais utilizadas na resolução do problema PVI composto pelas Equações 12 até 14 estão dispostos na Tabela 3.9.1.. As quatro rotinas simuladas para a Cinética de Monod de Alto Rendimento estão expostas no Apêndice B.

Tabela 3.9.1. Parâmetros Iniciais utilizados nas Simulações a partir do modelo de Monod de Baixo Rendimento.

Parâmetro	Valor	Unidade
S₀	1	(g.L⁻¹)
X₀	0,01	(g.L⁻¹)
P₀	0	(g.L⁻¹)

Fonte: Adaptado de Sakthpriya *et al* (2015).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

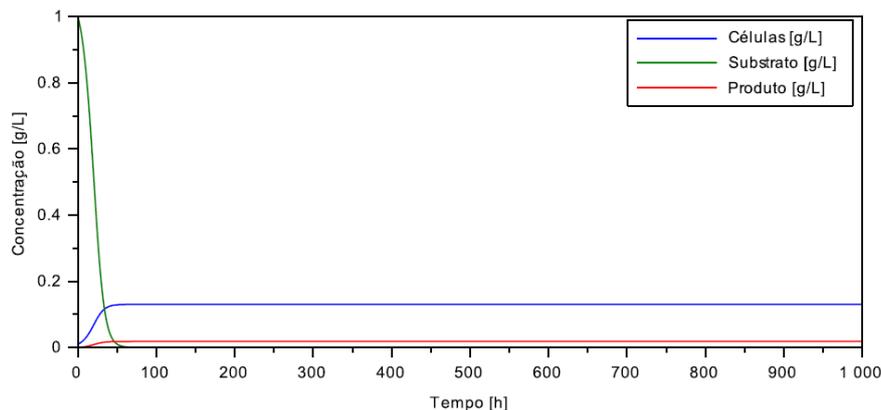
As simulações do modelo cinéticos de Monod para a produção de moléculas de biossurfactantes, através do consumo de frações pesadas de petróleo pelas bactérias *Pseudomonas P. aeruginosa* e *P. fluorescens* resultou nos gráficos expostos nas Figuras 4.1., 4.2., 4.3., 4.4., 4.5., 4.6., 4.7. e 4.8. abaixo, que foram dispostos de acordo com o rendimento baseado na quantidade de biossurfactante produzido por unidade de massa de biomassa consumida (g.g^{-1}), o parâmetro $Y_{P/X}$.

Em ambos os casos de Monod, de alto e de baixo rendimento, é possível identificar as distintas fases do crescimento celular. Na fase de crescimento exponencial, o número de células aumenta exponencialmente em razão da divisão celular, como foi matematicamente calculado através da Equação 7. Quando o substrato é plenamente consumido, a fase de crescimento exponencial termina e se inicia uma fase curta de crescimento decrescente, que é seguida por uma fase estacionária (LEHNINGER, 2017).

4.1. Modelo cinético de Monod – Baixo Rendimento

A partir da Figura 4.1 destacada abaixo, que emprega a simulação baseada no Modelo de Monod, utilizando n-Hexadecano como substrato e *Pseudomonas aeruginosa* como biomassa e o parâmetro $Y_{P/X}$ de baixo rendimento, nota-se que a fase de crescimento exponencial se estabelece em seu máximo aproximadamente 30 horas após o início do experimento e que o substrato de n-Hexadecano é totalmente esgotado em aproximadamente 50 horas. Ao final do crescimento celular, atinge-se uma concentração máxima de $0,02 \text{ g.L}^{-1}$ de Ramnolipídio, que é o produto de interesse e uma concentração de células de aproximadamente $0,12 \text{ g.L}^{-1}$. Além disso, através dos perfis de crescimento de células e de acumulação de produto, pode-se observar que a produção de biossurfactante é diretamente associada ao crescimento da biomassa, uma vez que ambos os processos ocorrem durante a produção de energia pela respiração celular.

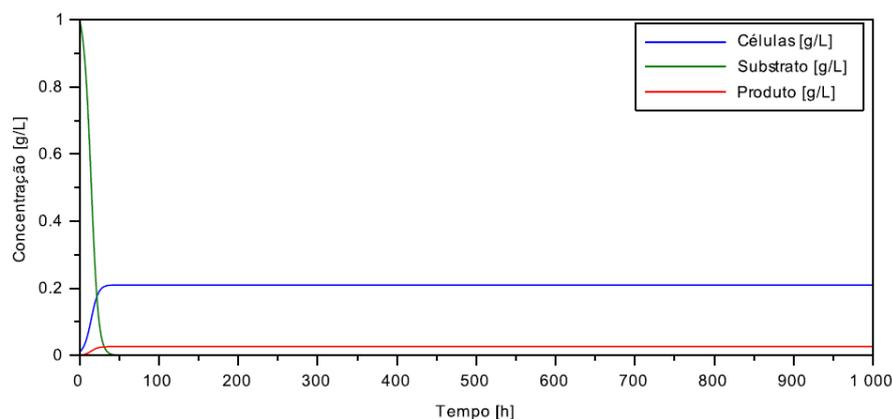
Figura 4.1. Variação da concentração de Células de *Pseudomonas aeruginosa*, a partir do consumo de substrato n-Hexadecano, através da cinética de Monod com $Y_{P/X}$ de baixo rendimento.



Fonte: Elaboração Própria (2022).

Já na Figura 4.2. abaixo, têm-se a simulação feita a partir de *P. fluorescens* como células de biomassa, n-Hexadecano como substrato principal e $Y_{P/X}$ de baixo rendimento, com a cinética de Monod. A fase de crescimento exponencial é máxima nas primeiras 20 horas do experimento e o substrato é totalmente consumido nas primeiras 50 horas de experimento. A concentração final de biossurfactante é de aproximadamente $0,025 \text{ g.L}^{-1}$. Comparando a Figura 4.2. com a Figura 4.1. observa-se que ambas têm rendimentos parecidos, com variação aproximada de $0,005 \text{ g.L}^{-1}$. No entanto, utilizando *P. fluorescens* como biomassa, obtém-se uma quantidade maior de células no meio reacional após o fim do crescimento celular, aproximadamente $0,1 \text{ g.L}^{-1}$, o que pode ser uma alternativa economicamente vantajosa com a possibilidade de reuso das células em bateladas seguintes.

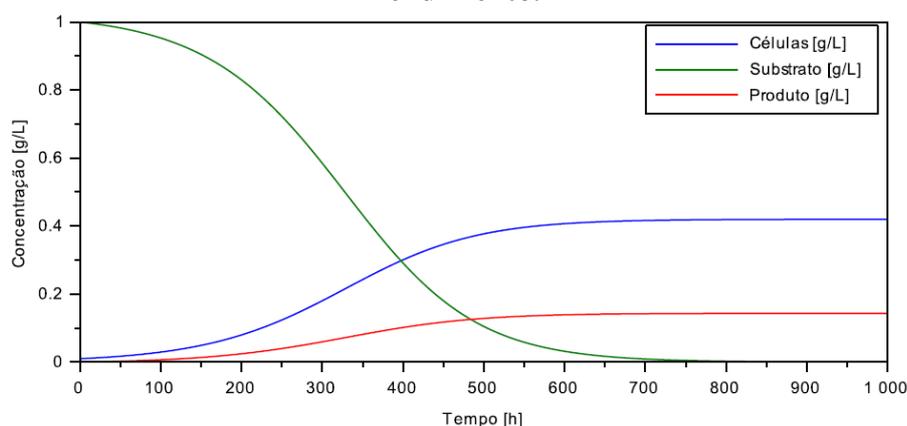
Figura 4.2. – Variação da concentração de Células de *Pseudomonas fluorescens*, a partir do consumo de substrato n-Hexadecano, através da cinética de Monod com $Y_{P/X}$ de baixo rendimento.



Fonte: Elaboração Própria (2022).

Na Figura 4.3 é possível observar a variação dos parâmetros de biomassa, produtos e substrato, utilizando n-Eicosano e *P. aeruginosa*, novamente com $Y_{P/X}$ de baixo rendimento. O crescimento exponencial se estabelece de forma mais lenta e mais expressiva na quantidade de produto formado, demonstrada pela curva de comportamento diferente das discutidas nas Figuras 4.1 e 4.2. O substrato de n-Eicosano é consumido de forma mais lenta, sendo totalmente consumido em aproximadamente 700 horas. Ao final, uma concentração de $0,12 \text{ g.L}^{-1}$ de biossurfactante e uma concentração de $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ de células foram formados, sendo essa combinação de fatores mais efetiva que as duas últimas simulações. De forma semelhante, a produção de biossurfactante é associado ao crescimento da célula.

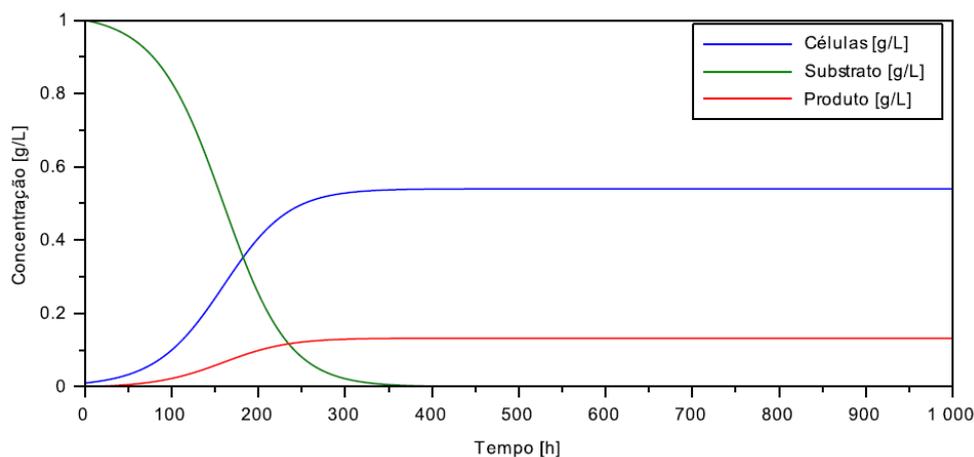
Figura 4.3. Variação da concentração de Células de *Pseudomonas aeruginosa*, a partir do consumo de substrato n-Eicosano, através da cinética Monod com $Y_{P/X}$ de baixo rendimento.



Fonte: Elaboração Própria (2022).

Por fim, a última simulação da Cinética de Monod de Baixo Rendimento é evidenciada na Figura 4.4 abaixo, através de n-Eicosano como substrato e *P. fluorescens* como célula. A fase de crescimento exponencial se estabelece em seu máximo aproximadamente 300 horas após o início do experimento e o substrato de n-Eicosano é consumido de forma exponencial em aproximadamente 350 horas, sendo totalmente esgotado. Uma concentração de $0,10 \text{ g.L}^{-1}$ de biossurfactante foi sintetizado e a quantidade de células de bactérias chega em seu máximo de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$.

Figura 4.4. Variação da concentração de Células de *Pseudomonas fluorescens*, a partir do consumo de substrato n-Eicosano, através da cinética de Monod com $Y_{P/X}$ de baixo rendimento.



Fonte: Elaboração Própria (2022)

A partir dos resultados obtidos nas quatro simulações modeladas a partir do Modelo cinético de Monod com $Y_{P/X}$ de Baixo Rendimento, que estão dispostos no Quadro 4.1., é possível analisar que as combinações de maior eficiência produtiva em relação ao produto foram entre *P. aeruginosa* e n-Eicosano ($Y_{P/X}$) e com relação a produção de células o rendimento foi maior nos parâmetros de *P. fluorescens* e n-Eicosano ($Y_{X/S}$), devido a sua concentração consideravelmente maior de células ao final do experimento. As combinações menos eficientes envolviam n-Hexadecano como substrato, provavelmente devido a massa molar superior dessa fração pesada de petróleo, levando mais tempo para que as bactérias conseguissem consumir esse substrato e o processo de crescimento celular fosse demorado. A produção de biomassa foi bem maior nas simulações a partir de n-Eicosano como substrato, acompanhando também os maiores rendimentos de produto.

Quadro 4.1. Resumo das principais variáveis da cinética celular de Monod, com $Y_{P/X}$ de baixo rendimento, após 1000 horas de experimento.

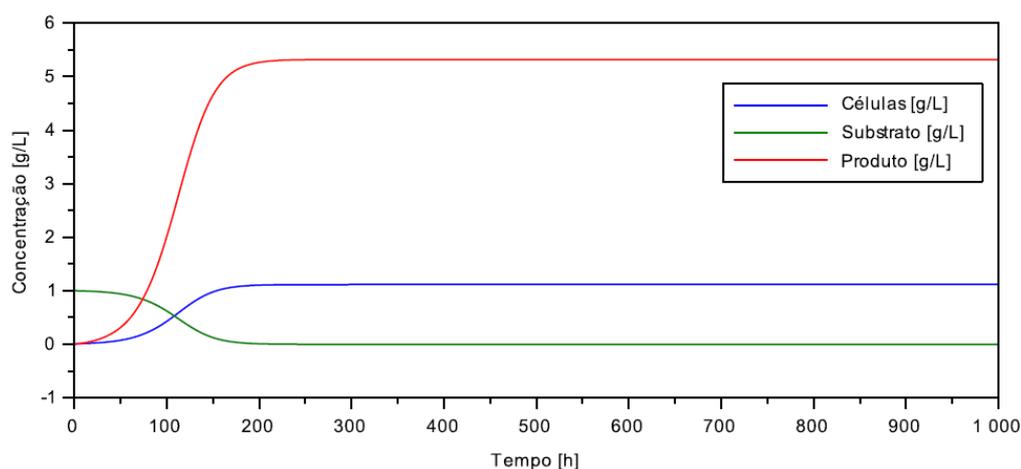
Substrato	Pseudomonas	S (g.L ⁻¹)	X (g.L ⁻¹)	P (g.L ⁻¹)
n-Hexadecano	<i>P. aeruginosa</i>	0	0,12	0,02
	<i>P. fluorescens</i>	0	0,2	0,025
n-Eicosano	<i>P. aeruginosa</i>	0	0,4	0,12
	<i>P. fluorescens</i>	0	0,5	0,10

Fonte: Elaboração Própria (2022).

4.2. Modelo cinético de Monod – Alto Rendimento

A análise quantitativa da produção de biossurfactante a partir do consumo dos dois tipos de substrato analisados pela síntese das bactérias *Pseudomonas*, *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa* também pode ser definida também a partir dos valores de alto rendimento $Y_{P/X}$, proposto por Sakthpuryia *et al* (2015). A primeira análise é sobre a combinação de n-Hexadecano utilizando *P. aeruginosa* e $Y_{P/X}$ de alto rendimento, destacada no gráfico da Figura 4.5..

Figura 4.5. Variação da concentração de Células de *Pseudomonas aeruginosa*, a partir do consumo de substrato n-Hexadecano, através da cinética de Monod com $Y_{P/X}$ de alto rendimento.

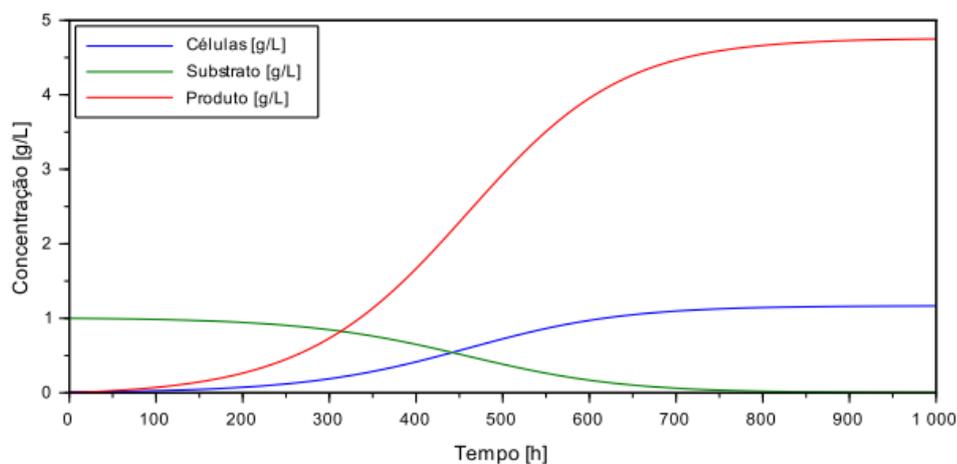


Fonte: Elaboração Própria (2022).

O comportamento das curvas segue um padrão clássico de cinética celular, como descrito por Lehninger (2017), destacando-se o consumo de substrato e a produção de novas células de Bactérias e de Biossurfactante. É possível notar que a concentração de biossurfactante atinge o máximo com o valor de $5,45 \text{ g.L}^{-1}$, ao final da fase de crescimento exponencial que tem duração aproximada de 150 horas. A quantidade final de células é de aproximadamente $1,0 \text{ g.L}^{-1}$. O substrato de n-Hexadecano não é totalmente consumido, sobrando um residual quase nulo e constante a partir das primeiras 150 horas. Com a análise do comportamento das curvas, assim como na cinética de Monod, os perfis cinéticos indicam que a produção de biossurfactante é associada ao crescimento.

A Figura 4.6. resume a simulação baseada em n-Hexadecano como substrato, a bactéria *P. fluorescens* como bactéria e com alto rendimento $Y_{P/X}$.

Figura 4.6. Variação da concentração de Células de *Pseudomonas fluorescens*, a partir do consumo de substrato n-Hexadecano, através da cinética de Monod com $Y_{P/X}$ de alto rendimento.

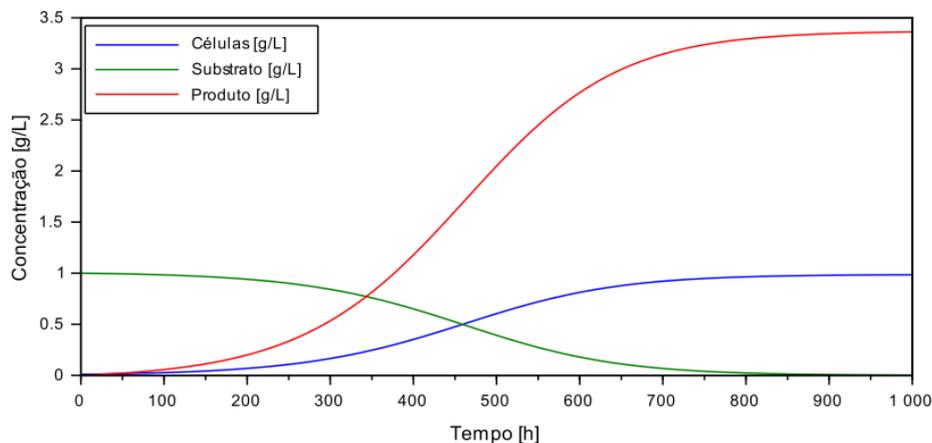


Fonte: Elaboração Própria (2022).

A partir da Figura 4.6., nota-se que a fase de crescimento exponencial se estabelece mais lentamente, aproximadamente 600 horas a partir do início do crescimento celular, atingindo a concentração de $4,75 \text{ g.L}^{-1}$ de Ramnolipídio ao final do experimento. O substrato de n-Hexadecano é esgotado em 800 horas. A concentração final de biossurfactante é comparativamente menor que a produzida pela *P. aeruginosa* e a concentração final de células é de aproximadamente $1,0 \text{ g.L}^{-1}$.

A partir do substrato de n-Eicosano, duas simulações foram feitas no SciLab 6.1.1., alterando somente a bactéria produtora de tensoativo, mantendo o $Y_{P/X}$ de alto rendimento. Esse modelo pode ser visualizado a partir das Figura 4.7. (utilizando *P. aeruginosa*) e 4.8.(utilizando *P. fluorescens*)

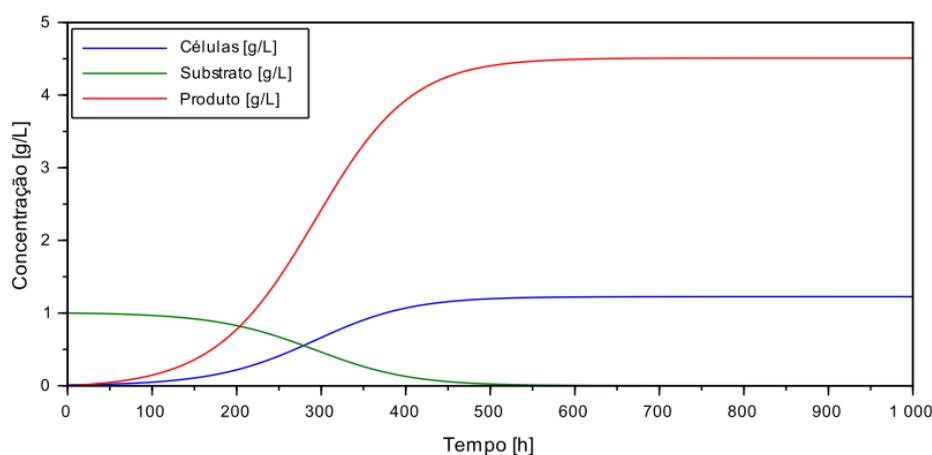
Figura 4.7. Variação da concentração de Células de *Pseudomonas aeruginosa*, a partir do consumo de substrato n-Eicosano, através da cinética de Monod com $Y_{P/X}$ de alto rendimento.



Fonte: Elaboração Própria (2022).

A partir da Figura 4.7. nota-se que a fase de crescimento exponencial se estabelece em seu máximo após aproximadamente 600 horas, formando o produto de interesse (biossurfactante Ramnolipídio) com concentração final de $3,4 \text{ g.L}^{-1}$, e as células têm concentração final de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$. Já o substrato é totalmente consumido em aproximadamente 900 horas. Comparativamente as simulações anteriores, essa combinação de parâmetros obteve a menor quantidade de produto formado devido ao menor rendimento $Y_{P/X}$.

Figura 4.8. Variação da concentração de Células de *Pseudomonas fluorescens*, a partir do consumo de substrato n- Eicosano, através da cinética de Monod com $Y_{P/X}$ de alto rendimento.



Fonte: Elaboração Própria (2022).

Na Figura 4.8., a combinação entre os parâmetros de n-Eicosano como substrato e *P. fluorescens* como célula bacteriana resultou em uma concentração de tensoativo que atinge uma concentração de 4,5 g.L⁻¹. Já as células têm uma concentração final de 1 g.L⁻¹ e consumo total do substrato ocorre em aproximadamente 550 horas.

Resumindo, os resultados obtidos nas quatro simulações modeladas a partir da cinética de Monod com $Y_{P/X}$ de alto rendimento estão dispostos na Quadro 4.2.. A partir de uma primeira análise, a combinação de maior eficiência de formação de produto acontece entre a bactéria *P. aeruginosa* e n-Hexadecano. As concentrações finais da quantidade de células bacterianas foram iguais em todas as quatro simulações. A combinação menos eficiente foi entre *P. aeruginosa* e n-Eicosano, refletido pelo menor rendimento analisado pelos experimentos de Sakthparya *et al* (2015). Por fim, o substrato foi consumido em sua totalidade em todos os casos.

Quadro 4.2. Resumo das principais variáveis da cinética celular de Monod, com $Y_{P/X}$ de Alto Rendimento, após 1000 horas de experimento.

Substrato	Pseudomonas	S (g.L ⁻¹)	X (g.L ⁻¹)	P (g.L ⁻¹)
n-Hexadecano	<i>P. aeruginosa</i>	0	1,0	5,45
	<i>P. fluorescens</i>	0	1,0	4,75
n-Eicosano	<i>P. aeruginosa</i>	0	1,0	3,4
	<i>P. fluorescens</i>	0	1,0	4,5

Fonte: Elaboração Própria (2022).

É válido ressaltar que os resultados obtidos retratam uma situação simplificada comparada a realidade, tratando-se de um modelo não-estruturado. Para esse tipo de modelo não se considera as reações individuais ou grupos de reações ocorrendo dentro das células, mas de modo simplificado simula-se a célula como uma única espécie em solução que interage com o meio. Essas considerações servem como base para futuros aprofundamentos, de forma a destacar a capacidade dessas bactérias ao consumir frações pesadas de petróleo, formando biossurfactantes mesmo que em pequenas quantidades.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

A realização deste trabalho teve como ponto de partida a comparação entre a produção de Ramnolipídeos, surfactantes de origem bacteriana, utilizando como biomassa as bactérias *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* e *P. fluorescens* na presença de parafinas (Frações pesadas de petróleo), formadas por n-Hexadecano e n-Eicosano. Os biossurfactantes têm demonstrado interessante potencial para a substituição dos surfactantes sintetizados quimicamente, tornando-se uma solução ambientalmente positiva. Com isso, o presente trabalho demonstrou os principais conceitos sobre biossurfactantes, as possíveis estruturas moleculares, suas características aplicações em diversos tipos de diferentes indústrias.

Os modelos de crescimento foram obtidos a partir de Equações Diferenciais e simuladas no ambiente SciLab 6.1.1, utilizando-se do modelo cinético de Monod. A partir das curvas obtidas por essas equações, foi possível comparar os resultados de crescimento de biomassa, utilização de substrato e produção de biossurfactante em oito possibilidades diferentes. Para tal, utilizou-se dos dados dispostos no artigo base desse trabalho, de Sakthpriya (2015).

Observa-se que não existem tendências ótimas de combinações de variáveis que resultam na maior produção de biossurfactante, sendo que quando se analisa o cenário a partir dos dados de Baixo Rendimento a maior produção quantitativa foi com n-Eicosano como substrato e *P. aeruginosa* como célula bacteriana, chegando à concentração de 0,12 g.L⁻¹, enquanto a mesma combinação de parâmetros resultou na menor quantidade de células das simulações de Monod de Alto Rendimento, com aproximadamente 3,4 g.L⁻¹. Já para o modelo desenvolvido com os valores de Alto Rendimento, a combinação de parâmetros que gerou maior concentração de biossurfactante foi gerada utilizando n-Hexadecano como substrato e *P. aeruginosa* como bactéria, chegando a uma concentração de 5,45 g.L⁻¹.

Apesar de ter se adequado parcialmente à previsão de condições relacionadas à produção do biossurfactante, os modelos cinéticos são considerados promissores desde que se levantem adequadamente os parâmetros cinéticos. Além disso, estudos apontam que sua utilização como substrato em processos biotecnológicos é uma alternativa para a produção de Ramnolipídio. Estas características fazem deles bons candidatos para aplicações em reservatórios de petróleo com condições ambientais variáveis, como altas pressões, temperatura, pH e salinidade.

Dessa forma, ainda é necessário um estudo mais aprofundado da cinética química, levantando também as variáveis críticas e de processo, para encarar uma produção mais

fidedigna com a realidade, criando possibilidades de se atingir a produção em larga escala em breve. Para dar continuidade ao trabalho, sugerem-se mais testes experimentais com os mesmos parâmetros de substrato e bactérias *Pseudomonas*, para que se possa traçar estatísticas com os resultados e obter com maior fidelidade qual combinação de variáveis resulta em um maior rendimento do produto de interesse, no caso os Ramnolipídios. Além desse estudo de parâmetros e cinética, poderiam ser utilizados conceitos de otimização computacional de processos, de forma a encontrar os pontos de ótimo nas equações e aumentando a possibilidade de utilização industrial desses microrganismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADETUNJI, A. I; OLANIRAN, A. O. Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: An overview. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, p. 669-679, 2021. DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.10.058. Acesso em julho de 2022.
2. ARGENTON A.B., Influência do Grau de Etoxilação no Comportamento de Álcoois Secundários Etoxilados. 2009. **Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Físico-Química, Instituto de Química**, Universidade Federal São Paulo. Acesso em julho de 2022.
3. BUENO S. M. Bactérias Produtoras de Biossurfactantes: Isolamento, Produção, Caracterização e Comportamento num Sistema Modelo. 2008. **Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Físico-Química**, Universidade Estadual de São Paulo. Campus São José do Rio Preto. Acesso em julho de 2022.
4. CHEVALIER Y. et al. Tensioactive properties of zwitterionic carboxybetaine amphiphiles. **Langmuir**, Volume 7, p. 848-853, 1991. DOI: 10.1021/la00053a007. Acesso em julho de 2022.
5. CHRISTOFI N., IVSHINA, I. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, p.915-929,2002. Acesso em julho de 2022.
6. DECESARO A. et al. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 947–954, 2013. DOI: 10.1590/S0100-40422013000700005. Acesso em agosto de 2022.
7. DRAKONTIS C. E.; AMIN S. Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. **Colloid & Interface Science**, v. 48, p. 77-90, 2020. DOI: 10.1016/j.cocis.2020.03.013. Acesso em julho de 2022.
8. ESTOPA S. B. et al. Production and separation of a trehalolipid biosurfactant. **Biochemical Engineering Journal**, p. 85-94, 2018. DOI: 10.1016/j.bej.2018.07.006. Acesso em julho de 2022.
9. GUDIÑA, E. J., RANGARAJAN V., RAMKRISHNA S., RODRIGUES L.R., Potential therapeutic applications of biosurfactants. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 12, p. 667–675, 2013. DOI: 10.1016/j.tips.2013.10.002. Acesso em julho de 2022.
10. GUEDES C.L.B., CORRER C.J., LOBO I., ABI-SAAB O.J.G., Tratamento de Solo Contaminado com Petróleo Utilizando Tensoativos e Peróxido de Hidrogênio. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, Volume 31, 2010. Acesso em julho de 2022.

11. HEWITT P.G.. **Física Conceitual**. 2022. Editora Bookman. Acesso em junho de 2022.
12. LEHNINGER T. M., NELSON D. L. & COX M. M. **Princípios de Bioquímica**. 7ª Ed.2017. Editora Artmed. Acesso em julho de 2022.
13. FELIPE L.O., DIAS S.C., Surfactantes sintéticos e biosurfactantes: vantagens e desvantagens. **Química e Sociedade**, 2016. DOI: 10.21577/0104-8899.20160079. Acesso em julho de 2022.
14. FENIBO E. O., IJOMA G.N., SELVARAJAN R., CHIKERE C.B.. Microbial surfactants: The next generation multifunctional biomolecules for applications in the petroleum industry and its associated environmental remediation. **Microorganisms**, v. 7, n. 11, p. 1–29, 2019. DOI: 10.3390/microorganisms7110581. Acesso em agosto de 2022.
15. MANIASSO N. Micellar media in analytical chemistry. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001. Acesso em agosto de 2022.
16. MAYER, R. M., SOBERON-CHAVES, G. Pseudomonas aeruginosas rhamnolipids: biosynthesis and potencial applications. **Applied Microbiology And Biotechnology**. v. 54, p. 625-633, 2000. DOI: 10.1007/s002530000443. Acesso em julho de 2022.
17. MEDINA D.A.V., CABAL L.F.R., SARTORE D. D., LIMA A. M., SANTOS-NETO A.J.. Solventes supramoleculares: Uma alternativa no micro extração em fase líquida para análises cromatográficas. **Scientia Chromatographica**, 2017. DOI: 10.4322/sc.2017.008. Acesso em agosto de 2022.
18. MESQUITA A. C. Uso das Técnicas de Oxidação Química e Biodegradação na Remoção de Alguns Componentes Recalcitrantes. **Tese de Doutorado, UFRJ – Programa de Pós-graduação em Físico-Química**. 158 p. 2004. Acesso em julho de 2022.
19. MOHAMMAD S. M., GAHANGIR A., SHAMSUN N., JAKIR H., Partial purification, and characterization of alkaline protease enzyme from Pseudomonas aeruginosa for tannery in Bangladesh, **Asian-Australasian Journal of Bioscience and Biotechnology**, 2016. Acesso em julho de 2022.
20. MOLLINEDO P. M. A, GONZÁLES V.C., Bactérias Gram-Negativas. **Revista de Actualización Clínica**, Volumen 49, 2014. P. 2609 – 2613. Acesso em julho de 2022.
21. MOREIRA C., Respiração. **Revista de Ciência Elementar**, Volume 1, 2013. p. 1 – 5. Acesso em julho de 2022.
22. MUHAMMAD, M. T.; KHAN, M. N. Eco-friendly, biodegradable natural surfactant (Acacia Cocinna): An alternative to the synthetic surfactants. **Journal of Cleaner Production**, v. 188, p. 678–685, 2018. DOI: 10.1016/j.jclepro.2018.04.016. Acesso em julho de 2022.

23. MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 183–198, 2005. DOI: 10.1016/j.envpol.2004.06.009. Acesso em agosto de 2022.
24. NITSCHKE, M., PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, Vol. 25, No. 5, 772-776, 2002. Acesso em junho de 2022.
25. OTZEN, D. E. Biosurfactants and surfactants interacting with membranes and proteins: Same but different? **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1859, n. 4, p. 639–649, 2017. DOI: 10.1016/j.bbamem.2016.09.024. Acesso em agosto de 2022.
26. SANTIAGO M.R.F., Produção de biosurfactante por *Bacillus subtilis*: caracterização, otimização e aplicação na indústria de petróleo. **Tese de Doutorado, UFRJ – Programa de Pós-graduação em Físico-Química. - Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 2019. Acesso em agosto de 2022
27. SANTOS C.V.M., VIEIRA I.M.M., SANTOS B.L.P., RUZENE D.S., SILVA D.P., Biosurfactante – Conceitos Gerais e Perspectivas. **Ambiente & Sociedade: Concepções, fundamentos, diálogos e práticas para conservação da natureza**. Volume 22.
28. SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L., A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina**, Ed. UFGRS/Ed. UFSC, 2001. DOI: 10.1590/S0102-695X2002000100005. Acesso em julho de 2022.
29. SAKTHPRIYA N., DOBLE M., SANGWAI J.S.. Biosurfactant from *Pseudomonas* species with waxes as carbon source – Their production, modeling and properties. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, Published by Elsevier. P. 100-111, 2015.
30. SANTA ANNA, L. M. SEBASTIAN, G. V. FREIRE D. M. G. MENESES, E. P., ALVES, T. L. M. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA 1. **Applied Biochem and Biotechnol.** p. 90-93, 2001.
31. SANTOS, A. S., SAMPAIO, A. P., VASQUEZ, G. S., SANTA ANNA, L. M., FREIRE, D. M. G., Evaluation of different carbon in nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain *Pseudomonas aeruginosa*. 2002. **Applied Bioch. and Biotechnol.** p. 98-100, 2002. DOI: 10.1385/abab:98-100:1-9:1025 Acesso em julho de 2022.
32. SILLANKORVA, S.; NEUBAUER, P.; AZEREDO, J. *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiIBB-PF7A. **BMC Biotechnolog**, [s. l.], ano 2018, v. 8, ed. 89, 30 set. 2022.

33. SOUZA, B. S. et al. Imidazolium-based zwitterionic surfactant: A new amphiphilic nanoparticle stabilizing agent. **Langmuir**, v. 28, n. 1, p. 833-840, 2011. DOI: 10.1021/la203501f. Acesso em julho de 2022.
34. TADROS, T. F. An introduction to surfactants. **Walter de Gruyter**, 2014. DOI: 10.1002/0471238961. Acesso em 13 de agosto de 2022.
35. THOMAS, J. E. et al. Fundamentos da Engenharia de Petróleo. 2. ed. Rio de Janeiro: **Interciência**, 2004. Acesso em agosto de 2022.
36. ULLMANN, F. **Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Editora Wiley-VCH Volume 40, 2019.
37. WINA, E.; MUETZEL,S.; BECKER,K..The Impact of Saponins or SaponinContaining Plant Materials on Ruminant Production - A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** [online], v.53, n.21, p.8093–8105, 2005. DOI: 10.1021/jf048053d. Acesso em julho de 2022.

APÊNDICE A

Simulação da produção de Biossurfactantes a partir do metabolismo da Bactéria *P. aeruginosa* com n-Hexadecano como substrato - Modelo de Monod com baixo rendimento.

```

clc;
clear all;

function [dy]=fun(t,y,Ks,YXS,YPS,minMax)
//Variação de biomassa em função do tempo
dy(1)=y(1)*((miMax*y(2))/(Ks+y(2)));
//Variação de substrato em função do tempo
dy(2)=-1/YXS*(dy(1));
//Variação do produto ao longo do tempo
dy(3)=YPX*(dy(1));
endfunction

t0=[0]; //Vetor da variável independente - tempo inicial
y0=[0.01;1;0]; //Vetor de condições iniciais
t=[0:0.1:1000]; //Vetor da variável independente - Vetor do tempo

//_____GRÁFICOS_____
//Dados do modelo cinético - Variação de células, substrato e produtos
//Dados do modelo - Células, substrato e produto

Ks=3.4;
YXS=0.12;
YPX=0.15;
miMax=0.5;

y=ode('stiff',y0,t0,t,fun)
subplot(2,2,1)
plot(t,y(1,:),'-',t,y(2,:),'-',t,y(3,:),'-')
a=gca()

```

```

a.data_bounds=[0 0;1000 1];
xlabel("Tempo [h]")
ylabel("Concentração [g/L]");
hl=legend(["Células [g/L]", "Substrato [g/L]", "Produto [g/L]"]);

```

Simulação da produção de Biossurfactantes a partir do metabolismo da Bactéria *P. fluorescens* com n-Hexadecano como substrato - Modelo de Monod com baixo rendimento.

```

clc;
clear all;
t0=[0]; //Vetor da variável independente - tempo inicial
y0=[0.01;1;0]; //Vetor de condições iniciais
t=[0:0.1:1000]; //Vetor da variável independente - Vetor do tempo

```

```

Ks=8.8;
YXS=0.2;
YPX=0.13;
miMax=1.9;
y1=ode('stiff',y0,t0,t,fun)

```

```

subplot(2,2,2)
plot(t,y1(1,:),'-',t,y1(2,:),'-',t,y1(3,:),'-')
a=gca()
a.data_bounds=[0 0;1000 1];
xlabel("Tempo [h]")
ylabel("Concentração [g/L]");
hl=legend(["Células [g/L]", "Substrato [g/L]", "Produto [g/L]"]);

```

Simulação da produção de Biossurfactantes a partir do metabolismo da Bactéria *P. aeruginosa* com n-Eicosano como substrato - Modelo de Monod com baixo rendimento.

```

clc;
clear all;
t0=[0]; //Vetor da variável independente - tempo inicial
y0=[0.01;1;0]; //Vetor de condições iniciais

```

```
t=[0:0.1:1000];//Vetor da variável independente - Vetor do tempo
```

```
Ks=7.2;
```

```
YXS=0.41;
```

```
YPX=0.35;
```

```
miMax=0.09;
```

```
y2=ode('stiff',y0,t0,t,fun)
```

```
subplot(2,2,3)
```

```
plot(t,y2(1,:),'-',t,y2(2,:),'-',t,y2(3,:),'-')
```

```
xlabel("Tempo [h]")
```

```
ylabel("Concentração [g/L]");
```

```
hl=legend(["Células [g/L]", "Substrato [g/L]", "Produto [g/L]");
```

Simulação da produção de Biosurfactantes a partir do metabolismo da Bactéria *P. fluorescens* com n-Eicosano como substrato - Modelo de Monod com baixo rendimento.

```
clc;
```

```
clear all;
```

```
t0=[0]; //Vetor da variável independente - tempo inicial
```

```
y0=[0.01;1;0]; //Vetor de condições iniciais
```

```
t=[0:0.1:1000]; //Vetor da variável independente - Vetor do tempo
```

```
Ks=8.9;
```

```
YXS=0.53;
```

```
YPX=0.25;
```

```
miMax=0.24;
```

```
y3=ode('stiff',y0,t0,t,fun)
```

```
subplot(2,2,4)
```

```
plot(t,y3(1,:),'-',t,y3(2,:),'-',t,y3(3,:),'-')
```

```
xlabel("Tempo [h]")
```

```
ylabel("Concentração [g/L]");
```

```
hl=legend(["Células [g/L]", "Substrato [g/L]", "Produto [g/L]");
```

APÊNDICE B

Simulação da produção de Biossurfactantes a partir do metabolismo da Bactéria *P. aeruginosa* com n-Hexadecano como substrato - Modelo de Monod com alto rendimento.

```

clc;
clear all;

function [dy]=fun(t,y,Ks,YPS,YPX,minMax)
YXS = YPS/YPX;
//Variação de biomassa em função do tempo
dy(1)=y(1)*((miMax*y(2))/(Ks+y(2)));
//Variação de substrato em função do tempo
dy(2)=-1/YXS*(dy(1));
//Variação do produto ao longo do tempo
dy(3)=YPX*(dy(1));
endfunction

t0=[0]; //Vetor da variável independente - tempo inicial
y0=[0.01;1;0]; //Vetor de condições iniciais
t=[0:0.1:1000]; //Vetor da variável independente - Vetor do tempo

// _____ GRÁFICOS _____
//Dados do modelo cinético - Variação de células, substrato e produtos
//Dados do modelo - Células, substrato e produto

Ks=3.4;
YPS=5.32;
YPX=4.81;

miMax=0.18;
y=ode('stiff',y0,t0,t,fun)
subplot(2,2,1)
plot(t,y(1,:),'-',t,y(2,:),'-',t,y(3,:),'-')

```

```
xlabel("Tempo [h]")
ylabel("Concentração [g/L]");
hl=legend(["Células [g/L]", "Substrato [g/L]", "Produto [g/L]"], pos=5);
```

Simulação da produção de Biossurfactantes a partir do metabolismo da Bactéria *P. fluorescens* com n-Hexadecano como substrato - Modelo de Monod com alto rendimento.

```
clc;
clear all;
t0=[0]; //Vetor da variável independente - tempo inicial
y0=[0.01;1;0]; //Vetor de condições iniciais
t=[0:0.1:1000]; //Vetor da variável independente - Vetor do tempo
```

```
Ks=8.8;
YPS=4.76;
YPX=4.11;
miMax=0.1;
y1=ode('stiff',y0,t0,t,fun)
```

```
subplot(2,2,2)
plot(t,y1(1,:), '- ', t,y1(2,:), '- ', t,y1(3,:), '- ')
//a=gca()
//a.data_bounds=[0 0;1000 1];
xlabel("Tempo [h]")
ylabel("Concentração [g/L]");
hl=legend(["Células [g/L]", "Substrato [g/L]", "Produto [g/L]"], pos=5);
```

Simulação da produção de Biossurfactantes a partir do metabolismo da Bactéria *P. aeruginosa* com n-Eicosano como substrato - Modelo de Monod com alto rendimento.

```
clc;
clear all;
t0=[0]; //Vetor da variável independente - tempo inicial
y0=[0.01;1;0]; //Vetor de condições iniciais
```

```

t=[0:0.1:1000];//Vetor da variável independente - Vetor do tempo
Ks=7.2;
YPS=3.37;
YPX=3.45;
miMax=0.08;

y2=ode('stiff',y0,t0,t,fun)
subplot(2,2,3)
plot(t,y2(1,:),'-',t,y2(2,:),'-',t,y2(3,:),'-')
xlabel("Tempo [h]")
ylabel("Concentração [g/L]");
hl=legend(["Células [g/L]", "Substrato [g/L]", "Produto [g/L]"], pos=5);

```

Simulação da produção de Biossurfactantes a partir do metabolismo da Bactéria *P. fluorescens* com n-Eicosano como substrato - Modelo de Monod com alto rendimento.

```

clc;
clear all;
t0=[0]; //Vetor da variável independente - tempo inicial
y0=[0.01;1;0];//Vetor de condições iniciais
t=[0:0.1:1000];//Vetor da variável independente - Vetor do tempo
Ks=8.9;
YPS=4.51;
YPX=3.71;
miMax=0.16;

y3=ode('stiff',y0,t0,t,fun)
subplot(2,2,4)
plot(t,y3(1,:),'-',t,y3(2,:),'-',t,y3(3,:),'-')
xlabel("Tempo [h]")
ylabel("Concentração [g/L]");
hl=legend(["Células [g/L]", "Substrato [g/L]", "Produto [g/L]"], pos=5);

```