

PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PA1 EM
BIORREATOR COM OXIGENAÇÃO POR CONTACTOR DE MEMBRANAS

Frederico de Araujo Kronemberger

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Aprovada por:

Prof. Cristiano Piacsek Borges, D.Sc.

Prof^a. Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc.

Prof. Marco Di Luccio, D.Sc.

Dra. Lidia Maria Melo Santa Anna, D.Sc.

Prof. Ronaldo Nobrega, D.Sc.

Prof. Reginaldo Ramos de Menezes, D.Sc.

Prof^a. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

OUTUBRO DE 2007

KRONEMBERGER, FREDERICO DE
ARAUJO

Produção de Rhamnolipídeos por
Pseudomonas aeruginosa PA1 em
Biorreator com Oxigenação por Contactor de
Membranas. [Rio de Janeiro] 2007

VII, 153 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ,
D.Sc., Engenharia Química, 2007)

Tese - Universidade Federal do Rio de
Janeiro, COPPE

1. Biossurfactante
2. Oxigenação por membranas

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram de algum modo para a realização deste trabalho.

Mais especificamente, agradeço em primeiro lugar a meus grandes orientadores Cristiano Borges e Denise Freire, por toda a ajuda e confiança no decorrer destes anos de pesquisa para esta tese. Este trabalho não seria realizado sem as suas idéias e o seu incentivo.

Agradeço também a meus pais por todo o apoio e liberdade para que mais este desafio fosse vencido.

A todos do PAM (Laboratório de Membranas/PEQ/COPPE) e do LaBiM (Laboratório de Biotecnologia Microbiana/Instituto de Química), pela companhia e ajuda em todos os momentos necessários.

Especialmente, aos grandes amigos Bob, Carol, Dani, Gabi, Karix, Lili, Luzia e Walter e a minha querida Chaline, companheira fiel durante este último ano de trabalho.

Agradeço também à pesquisadora do CENPES Lidia Santa Anna e toda sua equipe, pela ajuda e acolhida em seu laboratório no início deste trabalho.

À CAPES e à FAPERJ pelas bolsas de estudo.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PA1 EM BIORREATOR COM OXIGENAÇÃO POR CONTACTOR DE MEMBRANAS

Frederico de Araujo Kronemberger

Outubro/2007

Orientadores: Cristiano Piacsek Borges

Denise Maria Guimarães Freire

Programa: Engenharia Química

O objetivo deste trabalho foi a produção em biorreator de biossurfactantes do tipo ramnolipídeo por *Pseudomonas aeruginosa* PA1. Para viabilizar essa fermentação aeróbia, um contactor de membranas foi usado para o controle da concentração de oxigênio dissolvido no meio. Um sistema automatizado com o uso de um Controlador Lógico Programável foi desenvolvido para o controle dessa concentração. Assim, foi possível a condução de testes com e sem a adição suplementar de nitrogênio, além de testes em batelada simples e alimentada. Os resultados indicaram a viabilidade deste processo produtivo, sendo possível a obtenção de até 16,9 g/L de ramnolipídeos, com produtividade volumétrica de 44,3 mg/L.h e rendimento de substrato em produto de 0,34. A partir dos dados do sistema de oxigenação, foi possível avaliar a taxa específica de consumo de oxigênio destes microorganismos. Foi interessante notar a variação desta taxa ao longo do tempo, tendo seu valor elevado durante a fase exponencial do crescimento celular, atingindo até 85,0 miligramas de oxigênio por grama de célula por hora. Outro ponto foi a estabilização deste valor em torno de 20,0 mg/g.h, quando na fase estacionária de crescimento, onde a produção de ramnolipídeos é máxima. O sistema desenvolvido ainda apresenta a possibilidade de ser utilizado na condução de vários processos fermentativos, com microorganismos diversos.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

RHAMNOLIPID PRODUCTION BY *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PA1 IN A BIOREACTOR OXYGENATED BY A MEMBRANE CONTACTOR

Frederico de Araujo Kronemberger

October/2007

Advisors: Cristiano Piacsek Borges

Denise Maria Guimarães Freire

Department: Chemical Engineering

The aim of this work was to produce rhamnolipid type biosurfactant in a bench scale bioreactor by *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated from oil environments. In order to make this aerobic fermentation possible, a membrane contactor oxygenation device was developed. A Programmable Logic Controller was used to set the dissolved oxygen concentration. Then, it was possible to evaluate the influence of the supplement addition of the nitrogen source and to carry out tests in simple and fed batches. The results indicated the viability of this production process, making the scale-up possible. A concentration of 16.9 g/L of rhamnolipids was obtained, as well as a volumetric productivity of 44.3 mg/L.h and a substrate to product yield of 0.34. Using the data stored in a computer and the predetermined characteristics of the oxygenation device, it was possible to evaluate the specific oxygen uptake rate (SOUR) of this microorganism. The SOUR presents an increase from an initial value of 60.0 milligrams of oxygen per gram of cells per hour up to 85.0 mg/g.h, diminishing later to a value around 20.0 mg/g.h, at the stationary phase of growth. This system can still be used in the conduction of several other fermentative processes, with different microorganisms.

Índice

1. Introdução e Objetivos	1
2. Revisão Bibliográfica	11
2.1. Biossurfactantes: Definição e Classificação.....	11
2.2. Ramnolipídeos.....	13
2.2.1. Utilização.....	14
2.2.2. Produção.....	17
2.2.3. Bioquímica na Produção de Ramnolipídeos.....	22
2.3. Contactores Gás/Líquido.....	25
2.3.1. Equacionamento do Processo de Transferência de Massa.....	29
3. Materiais e Métodos	36
3.1. Produção de Ramnolipídeos.....	36
3.1.1. Manutenção de Microorganismo e Preparo do Pré-inóculo.....	36
3.1.2. Preparo do Inóculo.....	37
3.1.3. Esterilização.....	37
3.1.4. Produção de Ramnolipídeos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA1.....	37
3.1.5. Controle da Concentração de Oxigênio no Biorreator.....	39
3.1.6. Determinação da Concentração de Células.....	41
3.1.7. Quantificação de Glicerol.....	42
3.1.8. Quantificação de Ramnolipídeos.....	42
3.1.9. Quantificação de Nitrato.....	43
3.2. Contactores Gás/Líquido.....	43
3.2.1. Modelagem e Simulação do Oxigenador.....	44
3.2.2. Caracterização das Membranas Utilizadas.....	45
3.2.2.1. Testes de Permeação de Gases.....	50
3.2.2.2. Testes de Oxigenação.....	50
4. Resultados e Discussão	54
4.1. Simulação do Oxigenador.....	54
4.2. Testes de Permeação de Gases.....	67
4.2.1. Fibras Compostas Desenvolvidas.....	67
4.2.2. Fibras Compostas Comerciais.....	68
4.2.3. Fibras Densas Comerciais.....	69

4.3. Testes de Oxigenação.....	70
4.3.1. Fibras Microporosas.....	70
4.3.2. Fibras Compostas.....	75
4.3.3. Fibras Densas.....	80
4.4. Produção de Ramnolipídeos.....	83
4.4.1. Testes Preliminares.....	83
4.4.2. Testes Preliminares com Oxigenação por Membranas.....	88
4.4.3. Testes com Controle da Concentração de Oxigênio.....	101
4.4.4. Testes de Fermentações em Sequência.....	121
5. Conclusões e Sugestões.....	125
6. Referências Bibliográficas.....	130
7. Anexos.....	140

1. Introdução e Objetivos

Os avanços em ciência e tecnologia desde a revolução industrial vêm aumentando constantemente a possibilidade da exploração dos recursos naturais. Essa exploração tem gerado distúrbios nos ciclos elementares globais. A introdução de produtos químicos exógenos a determinado local pode sempre sobrepujar sua capacidade de auto remediação, resultando no acúmulo danoso destes produtos. Contaminações por hidrocarbonetos em derramamentos de petróleo e seus derivados têm causado sérios problemas ambientais e atenção extra está sendo dispensada ao desenvolvimento e implementação de novas tecnologias para a devida limpeza. Diversos métodos de remediação de solos e ambientes impactados com petróleo e seus derivados estão sendo desenvolvidos como alternativas ambientalmente corretas.

A degradação completa de petróleo cru requer a ação simultânea de diferentes grupos microbianos, já que uma simples espécie não é capaz de degradar todos os seus componentes. O principal fator que limita a biodegradação destes poluentes é a sua limitada disponibilidade aos microorganismos. Hidrocarbonetos geralmente se agregam a componentes do solo, sendo de difícil remoção ou degradação. Compostos tensoativos reduzem as tensões superficial e interfacial através de seu acúmulo na interface de fluidos imiscíveis ou de um fluido e um sólido, levando ao aumento de sua disponibilidade e subsequente biodegradação. Estes compostos podem ser produzidos por via química ou bioquímica e são denominados surfactantes.

Estas substâncias são utilizadas industrialmente com diversos objetivos, mas por muitos anos vem sendo sintetizadas quimicamente. Os compostos biológicos tensoativos, denominados biossurfactantes, que começaram a ser utilizados nas últimas décadas, são produzidos por algumas cepas bacterianas que degradam ou transformam os componentes do petróleo (RAHMAN *et al.*, 2002a, RAHMAN *et al.*, 2003). Estes biossurfactantes estão ganhando notoriedade já que podem ser utilizados em várias importantes aplicações industriais, devido às suas vantagens de biodegradabilidade, produção a partir de fontes renováveis e funcionalidade sob condições extremas (BANAT, 1995).

Microorganismos se mostram capazes de produzir vários produtos com excelentes propriedades tensoativas. Entretanto, seu uso em determinadas aplicações depende do custo de produção e purificação para atividades específicas, se comparados aos surfactantes sintéticos correspondentes. Deste modo, a maior parte dos trabalhos está concentrada na identificação de potenciais surfactantes, na avaliação de suas propriedades e na otimização dos processos fermentativos para sua produção (PARKINSON, 1985).

No momento, os biossurfactantes ainda não são capazes de competir economicamente no mercado com os compostos sintetizados quimicamente, devido aos altos custos de produção. Isso é resultado da metodologia ineficiente do bioprocessamento, da baixa produtividade das cepas microbianas e da necessidade do uso de substratos de custo elevado. Conseqüentemente, para que os biossurfactantes atinjam uma parcela significativa do mercado, é necessário que haja um maior conhecimento e habilidade tanto para a manipulação do metabolismo das cepas produtoras, como para a possibilidade do uso de substratos de menor custo, e o aperfeiçoamento tecnológico do processo de produção (HABA *et al.*, 2000).

Uma grande variedade de surfactantes é conhecida e, com o aumento da lista dos organismos produtores de biossurfactantes, o espectro de suas propriedades físicas e químicas irá se ampliar, levando à descoberta de compostos apropriados para aplicações especiais. O aperfeiçoamento da caracterização das cepas pode abrir caminho para a manipulação genética dos organismos, possibilitando o seu ajuste para um desempenho ótimo.

Em adição ao custo crescente e incerteza no abastecimento de petróleo, que é inclusive utilizado como matéria-prima para a produção de surfactantes por via química, o caráter prontamente biodegradável dos biossurfactantes indica que eles podem ser utilizados para remediar solos impactados com hidrocarbonetos sem a geração de outros problemas ambientais (FIECHTER, 1992) – um aspecto que irá apresentar maior importância nos processos industriais conforme a imposição de controles legislativos mais rigorosos.

O contínuo aumento no consumo e produção de produtos derivados de petróleo leva a um maior risco de acidentes ambientais resultantes de falhas nos sistemas de produção e distribuição. Nos últimos anos, vários acidentes com derramamentos de petróleo têm resultado na contaminação de ambientes terrestres e aquáticos. Entre os mais significativos, estão o derramamento de 40.000 metros cúbicos de petróleo do navio Exxon Valdez, no Alasca, em 1989, e o vazamento de 300.000 metros cúbicos de óleo do petroleiro Braer, no Reino Unido, em 1993. No Brasil, podem ser citados o derramamento de 1.300 metros cúbicos de óleo na Baía de Guanabara, no Rio de Janeiro e o vazamento de 4.000 metros cúbicos de óleo no Estado do Paraná, ambos em 2000 (SANTOS, 2003). Mais recentemente, no dia 26 de abril de 2005, após um acidente ferroviário, houve o derramamento de 100 metros cúbicos de óleo diesel no rio Caceribu, considerado um dos mais bem conservados que desembocam na Baía de Guanabara, atingindo também a Área de Proteção Ambiental de Guapimirim (ECOAGÊNCIA SOLIDÁRIA DE NOTÍCIAS AMBIENTAIS, 2005). Estes fatos, juntamente com a adoção de uma legislação mais rigorosa em termos de preservação ambiental, revelam a necessidade do desenvolvimento de técnicas eficientes para o controle e reparo dos danos resultantes.

Outra importante questão relacionada à produção de biossurfactantes está ligada à economia do processo produtivo. Os compostos sintetizados bioquimicamente devem apresentar baixos custos produtivos. Estes custos estão diretamente relacionados à produtividade da cepa microbiana selecionada, às matérias-primas utilizadas e aos processos de separação e purificação do produto final. Ainda, a concentração do produto necessária nas aplicações deve ser levada em consideração.

O crescente interesse nas aplicações potenciais de compostos tensoativos microbianos é baseado em suas variadas propriedades funcionais, que incluem emulsificação, desemulsificação, separação de fases, molhamento, formação de espumas, solubilização e redução de viscosidades de óleos pesados. Portanto, há muitas áreas de aplicações industriais onde os surfactantes químicos podem ser substituídos pelos biossurfactantes em campos tão diversos como a agricultura, a construção civil, indústrias alimentícias, têxteis, de papel e de petróleo. As notáveis vantagens dos

biossurfactantes sobre os compostos tensoativos sintetizados quimicamente incluem suas novas características estruturais e propriedades físicas, a produção a partir de substratos renováveis, a capacidade de serem modificados (através de técnicas de engenharia genética, biologia ou bioquímica) para atender a requerimentos específicos e, provavelmente a mais importante, a biodegradabilidade. Muitos surfactantes químicos causam problemas ambientais devido à sua resistência à biodegradação e à sua toxicidade quando se acumulam em ecossistemas naturais. Comparados aos surfactantes químicos, os biossurfactantes são muito seletivos, necessários em pequenas quantidades e efetivos sob várias condições de uso (FIECHTER, 1992).

Apesar de todas essas vantagens, o uso industrial de biossurfactantes é limitado, até o momento, a aplicações na indústria de petróleo, com especificações mínimas de pureza, de forma que o meio fermentado possa ser usado sem tratamento prévio. Diversas pesquisas vem sendo realizadas na aplicação de biossurfactantes para a recuperação microbiana melhorada de petróleo (*MEOR – Microbial Enhanced Oil Recovery*), já que se estima que somente de 30 a 50% do petróleo pode ser recuperado das jazidas naturais com as técnicas convencionais de bombeamento. Diferentes técnicas como recuperação melhorada com vapor e inundação com fogo podem ser bastante eficientes, porém a redução da tensão interfacial entre água e óleo no solo é um fator de extrema importância a ser levado em consideração. Deste modo, os biossurfactantes podem substituir os sulfonatos ou lignosulfonatos de petróleo, de custo elevado, que são atualmente usados para este fim. A produção de biossurfactantes *in situ* pela adição de uma cultura produtora sob o solo seria desejável, entretanto, isto iria requerer a utilização de cepas produtoras anaeróbias facultativas, termofílicas e barofílicas de difícil cultivo e obtenção.

Biossurfactantes também são usados para facilitar o transporte de frações pesadas de petróleo em tubulações, porque sua capacidade de reduzir a viscosidade contribui para a redução nos custos de transporte. Também já foram descritas aplicações bem sucedidas de biossurfactantes para a limpeza de tanques de óleo (FIECHTER, 1992).

A remediação microbiana de solos contaminados com hidrocarbonetos é uma tecnologia emergente envolvendo a aplicação de biossurfactantes. A biodegradação de hidrocarbonetos pelas populações microbianas nativas é o mecanismo primário pelo qual estes compostos são removidos do meio ambiente e a adição de biossurfactantes estimula essa degradação. A habilidade dos biossurfactantes de emulsificar misturas de hidrocarbonetos e água aumenta significativamente a sua degradação e assim, é potencialmente útil para o gerenciamento de derramamentos de petróleo em ambientes aquosos. Os biossurfactantes também são úteis na biorremediação de locais contaminados com metais pesados tóxicos, como urânio, cádmio e chumbo (MILLER, 1995).

Na indústria alimentícia, compostos tensoativos são usados como emulsificantes para o processamento das matérias-primas. A emulsificação tem um importante papel na formação da consistência e textura corretas, assim como na dispersão das fases. Na agricultura, estes compostos são necessários para a obtenção de boa molhabilidade de solos e também para se atingir uma distribuição uniforme de fertilizantes. Outra grande área de aplicação encontra-se na indústria de cosméticos, onde os tensoativos são utilizados em xampus e outros produtos (FIECHTER, 1992).

Muitos biossurfactantes e seus processos produtivos foram patenteados, mas somente alguns foram comercializados. Atualmente alguns produtos com base em biossurfactantes podem ser encontrados no mercado internacional, como o PD5[®] (PENDRAGON HOLDINGS LTD), vendido como um aditivo para combustíveis baseado em uma mistura de biossurfactantes do tipo ramnolipídeo e enzimas, o EC-601[®] (ECOHEM ORGANICS CO), comercializado como dispersante de hidrocarbonetos insolúveis em água (ramnolipídeos) e os produtos JBR[®] (JENEIL BIOSURFACTANT COMPANY), ramnolipídeos em soluções aquosas com diferentes graus de pureza ou em uma forma semi-sólida.

O custo de produção de biossurfactantes é aproximadamente de 3 a 10 vezes maior do que o de surfactantes químicos. Geralmente os biossurfactantes são produzidos durante o crescimento dos microorganismos em hidrocarbonetos, que normalmente são

caros, aumentando o custo total do processo. Contudo, outros substratos mais baratos e solúveis em água, como a glicose, o glicerol e o etanol vem sendo utilizados. Na busca por matérias-primas mais econômicas para a produção de biossurfactantes, os efluentes industriais e os resíduos agroindustriais se mostram como uma excelente opção (DESAI e BANAT, 1997).

Foram realizadas algumas tentativas de aumentar a produtividade de biossurfactantes através da manipulação de condições fisiológicas e da composição do meio. Também foram descritas tentativas de aumentar o rendimento produtivo e a possibilidade da produção de biossurfactantes com a utilização de substratos diversos através da manipulação genética. Recentemente, alguns genes responsáveis pela produção de biossurfactantes foram isolados e caracterizados. Assim, cepas microbianas com elevadas produtividades poderão ser construídas com o uso da engenharia genética para a produção de biossurfactantes em grande quantidade e com o uso de diversos substratos (DESAI e BANAT, 1997).

Muitas das aplicações potenciais consideradas para os biossurfactantes dependem de sua produção de forma econômica. Assim, muito esforço ainda é necessário para a otimização do processo em níveis de biologia e engenharia. Ademais, aspectos legais, como normas mais severas relativas à poluição do meio ambiente por atividades industriais e à saúde, também influenciarão as chances dos biossurfactantes substituírem seus equivalentes químicos (FIECHTER, 1992).

De acordo com GRUBER *et al.* (1993), os pré-requisitos para a produção competitiva de biossurfactantes são a obtenção de produtos com grande atividade, produzidos a partir de substratos baratos através de processos economicamente viáveis e com alto rendimento. Um aspecto favorável economicamente para a produção de biossurfactantes no Brasil, a partir de substratos de baixo custo, foi a sanção da Lei 11.097 de 13 de janeiro de 2005, que autoriza a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. A lei estabelece que até o ano de 2008 será autorizada a adição de 2% (B2) de biodiesel ao diesel de petróleo. A partir desse ano, a mistura será obrigatória neste percentual e será elevada para 5% a partir de 2013. Assim alguns projetos

privados já estão em andamento para a produção desse biocombustível, com capacidade instalada total acima de 100.000 metros cúbicos por ano. Como o principal subproduto da produção de biodiesel é o glicerol, este pode ser utilizado a um baixíssimo custo para a produção de biossurfactantes, que deverá passar da condição de *commodity* para rejeito de baixo custo (MA e HANNA, 1999, MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 1995). O maior desafio então recai no desenvolvimento tecnológico de um processo produtivo eficiente, de alto rendimento, e na redução das etapas posteriores de recuperação e purificação do produto.

A maioria dos microorganismos produtores de biossurfactantes conhecidos necessita de condições aeróbicas para a produção dos mesmos de modo eficiente. Mas o uso da aeração submersa convencional pode levar a formação de espumas muito estáveis, causando sérios problemas operacionais. E isso é particularmente válido para a produção de biossurfactantes do tipo ramnolípido. A elevada produção de espumas ainda é aumentada pela presença de proteínas extracelulares e pelas próprias células microbianas, resultando em grandes gastos para o controle das mesmas e muitas vezes inviabilizando o processo produtivo. Quebradores de espuma mecânicos não são muito eficientes e agentes anti-espumantes químicos podem alterar a qualidade do produto e o potencial poluente do efluente final do fermentador (GRUBER *et al.*, 1993).

Para superar essa dificuldade, um contactor de membranas pode ser utilizado para promover a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida sem a dispersão dessas fases (SANTA ANNA *et al.*, 2004). Este processo já foi descrito por GRUBER *et al.* (1993) e um processo semelhante, para utilização em fermentações alcoólicas, está patenteado pela L'Air Liquide (CUTAYAR *et al.*, 1990).

Um dos compostos biossurfactantes mais investigados são os ramnolípidos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*. Os ramnolípidos já se mostraram eficientes na lavagem e biorremediação de solos impactados com compostos oleosos, sendo utilizados em baixas concentrações (SANTA ANNA *et al.*, 2004, SANTA ANNA *et al.*, 2007).

A produção de biossurfactantes do tipo ramnolipídeo a partir de uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, PA1, isolada em poços de petróleo, já vem sendo estudada há cerca de 8 anos pelo Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM) em associação com o CENPES/Petrobrás. Entretanto, diversos problemas operacionais derivados da formação abundante de espuma durante o processo, inviabilizaram a produção destas substâncias em fermentadores convencionais de aeração por borbulhamento sem a adição de agentes anti-espumantes (SANTOS, 2003).

Sistemas integrando processos biotecnológicos e processos com membranas já vem sendo alvo de estudos nos últimos anos. DI LUCCIO (2001) investigou a produção de etanol e frutose em processo contínuo integrado a processos com membranas, utilizando uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. O etanol produzido era continuamente removido por pervaporação, enquanto que a frutose era removida por diálise através do uso de membranas líquidas. A remoção dos produtos leva ao maior consumo do substrato, maior rendimento e maior produtividade volumétrica.

FERRAZ *et al.* (2001) estudaram o acoplamento de uma unidade de eletrodialise a um reator onde ácido glucônico e sorbitol eram produzidos por células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em um módulo contendo fibras ocas microporosas de policarbonato. A unidade de eletrodialise permitiu uma eficiente remoção do ácido glucônico, mantendo o pH do meio constante, evitando a inibição enzimática sem a necessidade da adição de compostos básicos.

Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento do processo de produção de ramnolipídeos em um biorreator acoplado a um contactor de membranas, empregado para a oxigenação do meio de cultura, possibilitando o aumento da produtividade e a minimização dos problemas operacionais existentes. A produção destes biossurfactantes foi realizada com o emprego de um resíduo de baixo custo como fonte de carbono, o glicerol. Além disso, o estudo possibilita a abertura do leque de utilização deste bioprocessos para diversos outros produtos biotecnológicos.

Uma etapa inicial compreendeu a realização de uma modelagem matemática e simulação do sistema de oxigenação, com o objetivo de ampliar a compreensão sobre os efeitos das variáveis envolvidas nesse processo. Em seguida, foram avaliados os contactores que foram utilizados na oxigenação. No biorreator, foram avaliadas as condições de oxigenação e o modo de condução do processo.

Nos capítulos a seguir serão apresentados uma revisão concisa dos principais trabalhos lidando com o tema e seus aspectos correlatos, os principais materiais e metodologia empregada no desenvolvimento do trabalho experimental, os resultados alcançados e sua discussão, finalizando com as principais conclusões e sugestões para os trabalhos futuros em produção de biossurfactantes.

Este trabalho recebeu o Prêmio Petrobrás de Tecnologia 2007 – Tecnologia de Preservação Ambiental, na categoria Doutorado, e foi divulgado parcialmente nos seguintes veículos:

- KRONEMBERGER, F. A., SANTA ANNA, L. M. M., FERNANDES, A. C. L. B., MENEZES, R. R., BORGES, C. P., FREIRE, D. M. G., 2007, “Oxygen Controlled Biosurfactant Production in a Bench Scale Bioreactor”, *Applied Biochemistry and Biotechnology* – Artigo aceito para publicação.

- SANTA ANNA, L. M. M., SEBASTIAN, G. V., SORIANO, A. U., GOMES, A. C., VOLPON, A., FREIRE, D. M. G., PEREIRA JR, N., BORGES, C. P., KRONEMBERGER, F. A., MENEZES, E. P., 2004 (depósito), 2007 (publicação), “Biossurfactante e uso do mesmo em remediação de solos impactados por óleo”, Patente PI 0405952-2, Brasil.

- KRONEMBERGER, F. A., SANTA ANNA, L. M. M., FREIRE, D. M. G., BORGES, C. P., 2007, “Hollow Fiber Membrane Contactor for Oxygenation Controlled Biosurfactant Production”, NAMS (North American Membrane Society) Meeting, Orlando, EUA – Trabalho apresentado com a divulgação de seu resumo.

- KRONEMBERGER, F. A., SANTA ANNA, L. M. M., FERNANDES, A. C. L. B., FREIRE, D. M. G., BORGES, C. P., 2007, “Controle da Oxigenação na Produção de Biossurfactantes em Biorreator”, Congresso Íbero-Americano em Ciências e Tecnologia de Membrana - Citem, Campina Grande, Brasil – Trabalho apresentado com sua divulgação digital (CD Citem 2007).

- KRONEMBERGER, F. A., SANTA ANNA, L. M. M., FREIRE, D. M. G., BORGES, C. P., 2004, “Contactores de Membrana para Oxigenação de Meios de Cultivo”, XV Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Curitiba, Brasil - Trabalho apresentado com sua divulgação digital (CD Cobeq 2004).

2. Revisão Bibliográfica

Neste capítulo, são apresentadas a definição e as classificações dos compostos biossurfactantes. O enfoque maior recai sobre o estudo dos ramnolipídeos, com uma revisão sobre suas utilização e produção. Também serão abordados os contactores, com sua definição e algumas aplicações, além do equacionamento da transferência de oxigênio da fase gasosa para uma fase líquida em algumas membranas.

2.1. Biossurfactantes: Definição e Classificação

Os surfactantes são moléculas anfipáticas com porções tanto hidrofílicas quanto hidrofóbicas (geralmente hidrocarbonetos) que se repartem preferencialmente na interface entre fases fluidas, através de diferentes graus de polaridade e ligações de hidrogênio, como as interfaces entre óleo e água ou água e ar. Essas propriedades conferem aos surfactantes a capacidade de reduzir tensões superficiais e interfaciais e de promover a formação de microemulsões, onde água pode solubilizar hidrocarbonetos. Estas características conferem excelentes propriedades detergentes, emulsificantes, espumantes e dispersantes, que fazem dos surfactantes alguns dos mais versáteis produtos químicos.

Quase todos os surfactantes em uso são quimicamente derivados de petróleo. Estes compostos vêm sendo usados na indústria do petróleo para auxiliar a limpeza, como no caso de derramamentos, e para melhorar a recuperação de óleo dos reservatórios. Porém, estes compostos não são biodegradáveis e podem ser tóxicos para o meio ambiente. Já os biossurfactantes demonstram equivalentes propriedades emulsificantes e são biodegradáveis. Assim, há um crescente interesse na possibilidade do uso de biossurfactantes no transporte de petróleo em tubulações, no gerenciamento de derramamentos de óleo, na limpeza de tanques de armazenagem de óleo, na biorremediação de solos e na recuperação melhorada de petróleo (MEOR – *microbial enhanced oil recovery*). Ademais, o interesse em surfactantes de origem microbiana cresce continuamente devido à sua diversidade, a possibilidade de sua produção por

meios fermentativos a partir de substratos renováveis, e suas potenciais aplicações na indústria alimentícia (DESAI e BANAT, 1997).

Um biossurfactante é definido como uma molécula tensoativa produzida por células vivas, na maioria dos casos, por microorganismos. Uma das principais funções fisiológicas dos biossurfactantes é permitir o crescimento dos microorganismos em substratos imiscíveis em água, através da redução da tensão interfacial entre as fases, tornando o substrato disponível para a sua assimilação e metabolização.

Vários biossurfactantes são conhecidos e seu tipo, quantidade e qualidade são influenciadas pelo microorganismo produtor, pela natureza do substrato disponível, pela concentração de íons com nitrogênio, fósforo, magnésio, ferro e manganês no meio e pelas demais condições de cultura, como pH, temperatura, agitação, oxigenação e taxa de diluição (BANAT, 1995).

A atividade de um biossurfactante pode ser avaliada através do acompanhamento de mudanças nas medidas de tensões superficiais e interfaciais, na estabilização ou desestabilização de emulsões e no balanço hidrofílico-lipofílico. A tensão superficial pode ser facilmente medida com o uso de um tensiômetro. A tensão superficial de água destilada é aproximadamente igual a 72 mN/m, mas a adição de surfactantes pode reduzir este valor para até 30 mN/m (DESAI e BANAT, 1997).

Diferentemente dos surfactantes quimicamente sintetizados, que são classificados de acordo com a natureza de seus grupos polares, os biossurfactantes são classificados principalmente por sua composição química e sua origem microbiana. Em geral, sua estrutura inclui uma porção hidrofílica composta de aminoácidos ou peptídeos, ânions ou cátions ou mono, di ou polissacarídeos. A porção hidrofóbica é normalmente formada por ácidos graxos saturados, insaturados ou hidroxilados. As maiores classes de biossurfactantes incluem glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados.

Embora haja um grande número de relatos sobre a síntese de biossurfactantes por microorganismos que degradam hidrocarbonetos, alguns biossurfactantes podem ser obtidos a partir de compostos solúveis em água, como glicose, sacarose, glicerol e etanol, e os microorganismos produtores estão distribuídos em vários gêneros.

Os biossurfactantes mais conhecidos são os glicolipídeos, que consistem de carboidratos combinados com ácidos alifáticos ou hidroxialifáticos de cadeia longa. Entre os glicolipídeos, os mais investigados são os ramnolipídeos, os trealolipídeos e os soforolipídeos (DESAI e BANAT, 1997).

2.2. Ramnolipídeos

Os ramnolipídeos são os glicolipídeos mais estudados. São formados por uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico. A produção de glicolipídeos contendo ramnose por *Pseudomonas aeruginosa* foi primeiramente relatada por JARVIS e JOHNSON (1949). Os principais glicolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* são os ramnolipídeos dos tipos 1 e 2, L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato e L-ramnosil-L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato, respectivamente. Suas estruturas podem ser vistas na Figura 2.1. A formação de ramnolipídeos dos tipos 3 e 4, contendo uma molécula de ácido β -hidroxidecanóico e uma ou duas unidades de ramnose, respectivamente, metil-ésteres derivados dos ramnolipídeos 1 e 2 e ramnolipídeos com outras cadeias de ácidos graxos também já foram previamente reportadas (DESAI e BANAT, 1997).

A composição da mistura de ramnolipídeos pode influenciar bastante suas propriedades físico-químicas. Uma mistura de ramnolipídeos dos tipos 1 ($C_{28}H_{48}O_9$, 504 g/gmol) e 2 ($C_{32}H_{58}O_{13}$, 650 g/gmol) pode reduzir a tensão superficial da água para 29 mN/m, quando em concentração superior à concentração micelar crítica. Essa concentração foi determinada por SANTA ANNA *et al.* (2002), apresentando um valor de apenas 19 mg/L. Esse biossurfactante pode ser considerado não volátil, estável à temperatura ambiente e a 121°C por pelo menos 1 hora. Entretanto, essa mistura é

instável sob valores extremos de pH, devido à hidrólise da ligação glicosídica entre o açúcar e o lipídeo. Ela é rapidamente biodegradável e apresenta graduação mínima na classificação HMIS (*Hazardous Materials Identification System*) em todos os quesitos: saúde, inflamabilidade e reatividade (JENEIL BIOSURFACTANT COMPANY).

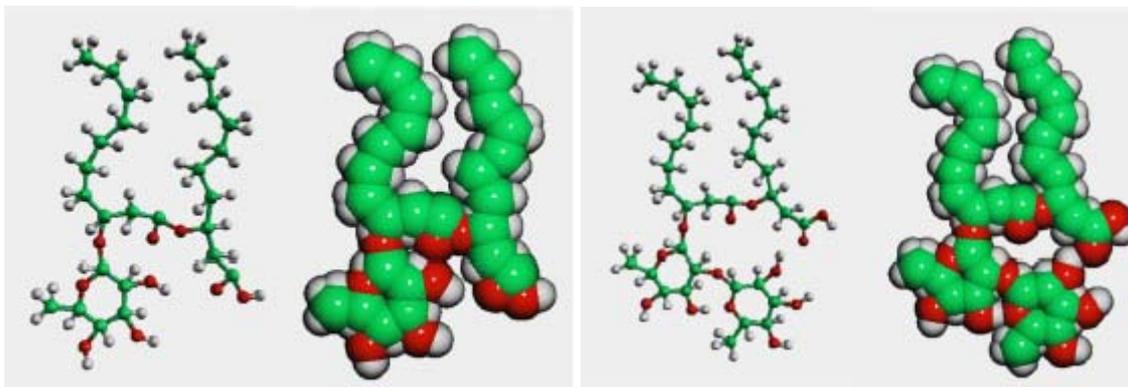


Figura 2.1: Estrutura dos ramnolipídeos tipos 1 e 2 (HELVACI *et al.*, 2004).

2.2.1. Utilização

Vários trabalhos vem sendo publicados na literatura acerca do uso de ramnolipídeos, tanto no estudo da degradação de compostos originários do petróleo quanto na lavagem e solubilização dos mesmos. Em termos de lavagem, os ramnolipídeos foram utilizados com sucesso na remoção de óleo de cascalho contaminado no acidente com o navio Exxon Valdez no Alasca (DESAI e BANAT, 1997).

RAHMAN *et al.* (2003) estudaram possíveis métodos para aumentar a taxa de biodegradação de borra de petróleo, reduzindo o tempo necessário para a biorremediação. Os autores observaram que o pré-tratamento de solo contaminado com hidrocarbonetos usando ramnolipídeos aumentou a disponibilidade destes compostos para o consórcio microbiano usado na biorremediação.

Outro estudo sobre a biodegradação de petróleo cru, com uso de bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* em presença de ramnolipídeos, foi reportado por GUO-LIANG *et al.* (2005). Em uma fermentação com o uso de petróleo como única

fonte de carbono, inicialmente não foi observado crescimento celular ou produção de ramnolipídeos. Já com a adição de ramnolipídeos no início de outra fermentação, para uma concentração de 0,22g/L, ou de glicerol, uma fonte de carbono facilmente utilizável para a produção dos biossurfactantes, foi reportada uma degradação superior a 58 % de todo o petróleo alimentado. Os ramnolipídeos, fornecidos direta ou indiretamente, facilitaram o acesso das bactérias ao petróleo, estimulando a sua biodegradação.

URUM *et al.* (2004) investigaram a remoção de petróleo de amostras de solo com o uso de ramnolipídeos e de um surfactante sintético (SDS – dodecil-sulfato de sódio). A remoção de petróleo das amostras usando os dois tipos de surfactante foi considerada dentro da mesma faixa de reprodutibilidade experimental. Assim, os autores recomendaram o uso dos ramnolipídeos por suas vantagens de biodegradabilidade e menor toxicidade.

SANTA ANNA *et al.* (2002, 2007) testaram a toxicidade do ramnolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 e compararam com a de um surfactante quimicamente sintetizado, o Corexit[®]. Este surfactante químico, com uma característica aniônica idêntica a dos ramnolipídeos produzidos, apresentou toxicidade 10 vezes superior a do biossurfactante.

NOORDMAN *et al.* (2002) determinaram a influência de ramnolipídeos na degradação de hexadecano por uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. O biossurfactante atuou estimulando a assimilação deste substrato pelas células aumentando sua degradação a um nível maior do que qualquer surfactante sintetizado quimicamente testado nesse trabalho, nas mesmas concentrações. Em outro trabalho, BAI *et al.* (1997) estudaram um biossurfactante aniônico monoramnolipídico produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em termos de seu potencial para a remoção de hexadecano residual de colunas de areia. Foi observado um aumento na solubilização deste alceno em água com diferentes concentrações de ramnolipídeo. O uso de uma solução de ramnolipídeos aumentou a eficiência da lavagem de uma coluna de areia impactada com hexadecano, se comparado ao uso de água pura ou de outros

surfactantes quimicamente sintetizados normalmente usados em experimentos de remediação.

A capacidade de diversos surfactantes em formar espuma para a remoção de pentaclorofenol – um agente preservativo de madeiras altamente tóxico – do solo foi estudada por MULLIGAN e EFTEKHARI (2003). O surfactante JBR425, do tipo ramnolípido, produzido pela empresa Jeneil Biosurfactant, apresentou a capacidade de gerar espumas de altas qualidade e estabilidade. A injeção dessa espuma nas amostras contaminadas resultou na remoção de até 68 % de pentaclorofenol.

Quanto à remoção de metais pesados, MULLIGAN *et al.* (2001) utilizaram experimentos de lavagem em batelada para avaliar a possibilidade do uso de biosurfactantes para a remoção destes de sedimentos. Comparado à lavagem com água pura, o uso de uma solução 0,5% de ramnolídeos com pH 10,0 levou a uma remoção de 38 vezes mais cobre e 4 vezes mais zinco.

JUWARKAR *et al.* (2007) avaliaram a remoção de cádmio e chumbo de solos artificialmente contaminados. A lavagem destes solos com água pura levou à remoção de apenas 2,7 % de cádmio e 9,8 % de chumbo, enquanto que a lavagem com uma solução com 0,1 % de ramnolídeos de *Pseudomonas aeruginosa* possibilitou a remoção de 92 % de cádmio e de 88 % de chumbo em experimentos com 36 horas de duração. Estes trabalhos indicam que os ramnolídeos podem ser usados com grande eficiência na remoção de metais pesados de solos contaminados.

Outro grande mercado para os biosurfactantes é a polimerização em emulsões para tintas e revestimentos industriais. Outros usos ainda podem ser o têxtil, na fabricação de fibras, além do tratamento de metais, escavações, tratamento de águas e como agentes preservativos para madeiras. Biosurfactantes também são usados nas indústrias alimentícia e cosmética, na limpeza industrial e em produtos químicos agrícolas, para diluir e dispersar fertilizantes e pesticidas, além de elevar a penetração dos compostos ativos nas plantas (BANAT *et al.*, 2000).

Dependendo de suas especificações, os biossurfactantes podem ser empregados em uma série de aplicações distintas, desde a estabilização de nanopartículas ao tratamento de queimaduras. Como reportado por XIE *et al.* (2006), os ramnolipídeos podem ser utilizados para a estabilização de nanopartículas de prata, evitando sua agregação por interações eletrostáticas. E de acordo com STIPCEVIC *et al.* (2006), em testes em ratos, o tratamento de queimaduras com solução de ramnolipídeos a 0,1 % possibilitou o fechamento do ferimento com 35 dias, enquanto os que não foram tratados com os biossurfactantes ainda apresentavam ferimentos abertos com 35, e até com 45 dias.

2.2.2. Produção

Os biossurfactantes são produzidos por uma variedade de microorganismos, secretados extracelularmente ou anexados a partes da célula, predominantemente durante crescimento em substratos imiscíveis com a água. Mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* que não produziam biossurfactantes apresentaram pequeno crescimento em n-parafina e hexadecano e a adição de ramnolipídeos ao meio restaurou o crescimento destas bactérias. Do ponto de vista fisiológico, a produção de uma quantidade grande de uma substância polimérica seria um desperdício, se não apresentasse nenhuma função. A produção dos biossurfactantes favorece o crescimento de microorganismos em substratos imiscíveis em água, além de poder ser utilizado como reserva energética, na regulação do acoplamento/desacoplamento do microorganismo em superfícies, na regulação do transporte de metais pesados, como fator de virulência e como agente antimicrobiano (DESAI e BANAT, 1997).

Entre os parâmetros influenciando o tipo e a quantidade de biossurfactante produzido, estão a natureza da fonte de carbono, possíveis limitações nutricionais e outros parâmetros físicos e químicos, como oxigenação, temperatura e pH. Além disso, um fator primordial é a identidade do microorganismo ou cepa usada no processo produtivo. Em muitos casos, as sínteses das porções hidrofílica e hidrofóbica do surfactante fazem parte do metabolismo primário, mas estão relacionadas a duas diferentes rotas de degradação de carboidratos e hidrocarbonetos. Na maioria dos casos,

o crescimento em hidrocarbonetos induz a síntese de biossurfactantes, mas isso não é um pré-requisito para todos os organismos. A mudança no substrato frequentemente altera a estrutura do produto, alterando assim as propriedades do surfactante. A escolha da fonte de carbono é, então, determinada pela aplicação específica pretendida. A fonte e a concentração de nitrogênio, assim como a relação carbono/nitrogênio também influencia a síntese de biossurfactantes (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984).

Uma contribuição adicional para se alcançar excelentes produtividades e rendimentos pode ser fornecida pela engenharia genética com as cepas produtoras. Através do maior conhecimento das rotas metabólicas de produção, os genes que codificam as enzimas envolvidas podem ser expressos em hospedeiros para permitir o uso de substratos mais baratos e facilitar a recuperação do produto, além de substituir produtores patogênicos, como as bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa*.

Grande parte dos estudos está direcionada para o aumento da eficiência e da viabilidade econômica dos bioprocessos para permitir a competição dos biossurfactantes com os compostos tensoativos quimicamente sintetizados. Até o momento, poucos sistemas de produção economicamente viáveis para biossurfactantes foram reportados. O esperado desenvolvimento das aplicações dos biossurfactantes é dificultado pelos altos custos de produção, pela falta de aceitação de algumas cepas produtoras e pelos altos graus de pureza requeridos para o uso nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosméticos (FIECHTER, 1992).

A máxima produção de ramnolipídeos é normalmente verificada no fim da fase exponencial de crescimento, sendo descrita por alguns autores como uma produção não associada ao crescimento (VENKATA RAMANA, 1991).

BENINCASA *et al.* (2002) estudaram a produção de ramnolipídeos por uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, isolada em solo contaminado com petróleo, a partir de um resíduo do processamento de óleo de girassol. O meio utilizado na produção continha nitrato, fosfatos, fontes de magnésio, potássio, ferro e cálcio, extrato de levedura e traços de boro, cobre, manganês, molibdênio e zinco. Foi observado um

aumento na produção do biossurfactante depois de esgotada a fonte de nitrogênio. Na produção em batelada em um fermentador, foi observado que o aumento no fornecimento de oxigênio elevou a concentração final obtida de ramnolipídeos. Também foi reportado o efeito de uma realimentação (batelada alimentada) das fontes de carbono e nitrogênio. Houve um pequeno aumento na concentração de biomassa acompanhado de um aumento significativo na produção de ramnolipídeos. A produtividade obtida foi de 0,2 g/L.h com uma concentração final de 15,9 g/L.

GUERRA-SANTOS *et al.* (1984) investigaram um processo contínuo para a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* a partir de glicose. Foi proposta uma relação carbono/nitrogênio ótima e igual a 18 com o uso de nitrato como fonte de nitrogênio. A concentração máxima de ferro, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, recomendada pelos autores foi de 27,5 μg por grama de glicose, e foi observado que uma razão carbono/fosfato abaixo de 16 maximiza a produção de ramnolipídeos, sendo necessário certo excesso de fosfato para a formação de ramnolipídeos. A otimização elaborada neste estudo levou a um aumento de quase 10 vezes na concentração final de biossurfactante produzido, chegando a 1,5 g/L de ramnolipídeos no processo contínuo. Contrariamente, MULLIGAN *et al.* (1989) reportaram o aumento na produção em batelada do biossurfactante por uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* a partir de glicose em um meio limitado em fosfato.

Posteriormente, REILING *et al.* (1986) desenvolveram um processo em escala piloto para a produção contínua de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*, dando continuidade ao trabalho de GUERRA-SANTOS *et al.* (1984). O volume reacional utilizado era de 23 litros e foi obtida uma produtividade de 147 mg/L.h, correspondendo a uma produção diária de 80 gramas de biossurfactante, além de um rendimento de 77 mg por grama de glicose. A purificação e o enriquecimento consistiam em uma cromatografia de adsorção seguida de uma cromatografia de troca iônica. Foi obtida uma recuperação acima de 60 % do produto com 90 % de pureza.

HABA *et al.* (2000) investigaram a possibilidade da produção de ramnolipídeos a partir de resíduos de óleos de fritura, já que o uso deste tipo de substrato de baixo

custo é um dos pré-requisitos para a produção economicamente competitiva de biossurfactantes. O aumento da concentração inicial da fonte de nitrogênio, nitrato, causou um aumento na concentração de biomassa e na produção de ramnolipídeos. A maior produtividade foi obtida com uma relação carbono/nitrogênio igual a 8, atingindo 2,7 g/L, expressos em ramnose.

GRUBER *et al.* (1993) também reportaram a necessidade na limitação nas concentrações de nitrogênio e ferro para a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*. Utilizando um reator do tipo CSTR, com reciclo de células e um contactor de membranas para a oxigenação e retirada de gás carbônico, foi obtida produtividade volumétrica de até 545 mg/L.h de ramnolipídeos a partir de glicose, com produtividade específica de 41 mg/g.h quando usada taxa de diluição igual a 0,18 h⁻¹.

Nos últimos anos, alguns resultados relevantes também foram obtidos pelo LaBiM (Laboratório de Biotecnologia Microbiana, IQ/UFRJ) e pelo CENPES e publicados na literatura. SANTOS *et al.* (2002) investigaram a produção de ramnolipídeos pela cepa PA1 de *Pseudomonas aeruginosa*. Utilizando glicerol como substrato, foi obtido um aumento de 62% na produtividade volumétrica com o aumento da concentração inicial de células de 0,32 para 3,0 g/L, atingindo 23,2 mg/L.h. Outro parâmetro investigado foi a relação carbono/nitrogênio. Os melhores resultados foram obtidos com maiores relações C/N, corroborando os demais resultados reportados na literatura que indicam um aumento na produtividade em condições limitantes de nitrogênio. Quanto à fonte de carbono, os resultados indicaram o uso do glicerol. O uso desse substrato levou à produção de 3,34 g/L do biossurfactante expressos em ramnose, enquanto que a utilização de etanol, óleo de oliva ou de soja, resultou em valores de 2,02, 1,61 e 1,59 g/L, respectivamente, em iguais condições de fermentação. Também foi investigada a proporção entre as espécies de ramnolipídeos produzidas. Com o uso de glicerol como substrato, foram produzidos aproximadamente 85% de diramnolipídeos e 15% de monoramnolipídeos (ramnolipídeos dos tipos 2 e 1, respectivamente).

SANTA ANNA *et al.* (2002) também estudaram a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1. A comparação entre a utilização de n-hexadecano, óleo parafínico, óleo de babassu e glicerol, como fontes de carbono, confirmou o fato de o glicerol ser uma fonte mais facilmente assimilável pelos microorganismos, resultando em maior produtividade. Com o uso de 1,0% de glicerol, a fase estacionária da fermentação foi atingida após 40 horas. Nesse ponto, houve um significativo aumento na produção de ramnolipídeos, revelando o comportamento típico de um metabólito secundário. Como fontes de nitrogênio, foram testados o nitrato de sódio, o sulfato de amônio e a uréia. Os experimentos revelaram que o uso do nitrato de sódio foi mais efetivo na produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1. Este resultado está de acordo com outros reportados na literatura.

Em outros trabalhos do mesmo grupo de pesquisa, foram investigadas as influências das concentrações nos íons ferro e fosfato e do pH do meio de cultivo. Ao contrário do observado por GUERRA-SANTOS *et al.* (1984), a variação na concentração do íon Fe^{+2} não resultou em mudança significativa na produtividade volumétrica de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1. Entretanto, foi observada a diminuição da produção de proteínas extracelulares com o aumento da concentração de ferro. Considerando que essas proteínas estão em grande parte relacionadas com fatores de virulência dessa bactéria, foi recomendado a utilização de meios com concentração de ferro em torno de 30 $\mu\text{mol/L}$. A variação na concentração de íons fosfato não apresentou efeitos significativos na produção de ramnolipídeos ou de proteínas extracelulares. Optou-se então pelo uso da concentração de 62 mmol/L de PO_4^{-3} , garantindo o tamponamento do meio de cultivo e a disponibilidade do fósforo como nutriente essencial. O valor de pH igual a 7,0 se destacou como a melhor condição para a produção de ramnolipídeos (SANTOS, 2003).

Ainda neste grupo, TAVARES (2007) investigou a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em biorreator com o controle da formação de espuma realizado com a adição de um agente anti-espumante. A condução de uma batelada simples resultou na produtividade de 44,0 mg/L.h de ramnolipídeos. A alimentação extra da fonte de nitrogênio com 24 e 48 horas de fermentação levou ao

aumento substancial da concentração celular no biorreator e, conseqüentemente, elevou a produtividade em cerca de 75 %, para 77,1 mg/L.h.

Recentemente, com a busca pelo uso de substratos de baixo custo para a produção de biossurfactantes, diversos trabalhos foram publicados sobre a produção de ramnolipídeos a partir de diversos óleos, como os de soja (RAHMAN *et al.*, 2002b, RAZA *et al.*, 2007, CHA *et al.*, 2007), de oliva (WEI *et al.*, 2005) e de castanha do Pará (COSTA *et al.*, 2006). Nestes trabalhos, as fermentações foram conduzidas em frascos agitados com pequenos volumes e com o uso de diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, com exceção de RAZA *et al.* (2007), que utilizaram uma cepa de *Pseudomonas putida* submetida à mutagênese com raios gama. Quando óleo de soja foi utilizado como principal fonte de carbono, os valores de produtividade volumétrica de ramnolipídeos obtidos pelos autores variaram entre 15 mg/L.h (RAHMAN *et al.*, 2002b) e 50 mg/L.h (CHA *et al.*, 2007). Quando a fonte de carbono foi óleo de oliva, a produtividade obtida foi de 26 mg/L.h (WEI *et al.*, 2005). O melhor resultado foi obtido por COSTA *et al.* (2006) com a utilização de óleo de castanha do Pará como fonte de carbono. Foi obtida uma concentração de 9,9 g/L de ramnolipídeos, com uma produtividade igual a 83 mg/L.h.

2.2.3. Bioquímica da Produção de Ramnolipídeos

A biossíntese dos ramnolipídeos se baseia em uma seqüência de reações de transferência do grupo glicosil, catalisadas por enzimas ramnosiltransferases específicas. Na síntese do monoramnolipídeo, a enzima ramnosiltransferase 1 (Rt1) é responsável pela transferência de uma timidina difosfo-L-ramnose (TDP-ramnose) para o β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (β -hdd). Já na síntese do diramnolipídeo, a enzima Rt2 é responsável pela transferência de mais uma molécula de TDP-ramnose para o monoramnolipídeo formado anteriormente. Os genes que codificam a biossíntese, regulação e indução da enzima Rt1 estão organizados em um grupo gênico denominado *rhlABRI*, localizado no cromossoma de *Pseudomonas aeruginosa*. Os genes que codificam a enzima Rt2, por sua vez, não se encontram caracterizados ainda (SANTA ANNA, 2000). A via de produção dos ramnolipídeos está relacionada à

produção de polihidroxicarboxilatos, os PHA. Estes compostos são utilizados como reserva energética por diversas bactérias. Especificamente nas bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa*, os polímeros de β -hidroxidecanoato são armazenados (SANTOS, 2003).

A síntese dos ácidos graxos dos ramnolipídeos se difere da via biossintética normal de *Pseudomonas aeruginosa* no nível da redução ceto-acil (CAMPOS-GARCIA *et al.*, 1998) A enzima responsável por retirar os precursores dos ácidos graxos presentes nos ramnolipídeos de vias biossintéticas normais é chamada RhlG. Esta é especificamente envolvida na produção de ramnolipídeos e também afeta a síntese de PHA (poli-hidroxi alcenoato). Foi recentemente descrito que RhlG está envolvida no fornecimento de ACP (proteína carreadora da porção acil) para precursores de ácidos graxos. O comprimento da cadeia da porção de ácidos graxos dos ramnolipídeos parece menos afetada pelo meio de cultura ou fonte de carbono do que o PHA. É sugerida uma origem em comum entre PHA e ramnolipídeos e, recentemente, foi reportada evidência direta experimental em suporte a esta relação metabólica (SOBERÓN-CHÁVEZ *et al.*, 2005a). O início do ciclo produtivo dos ramnolipídeos é apresentado nas Figuras 2.2 e 2.3.

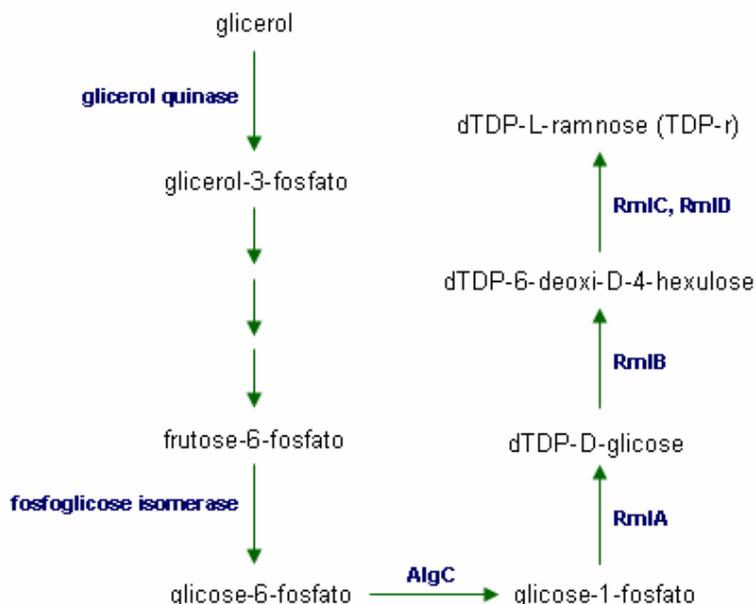


Figura 2.2: Esquema da biossíntese de precursores de ramnolipídeos (adaptado de SOBERÓN-CHAVEZ *et al.*, 2005b).

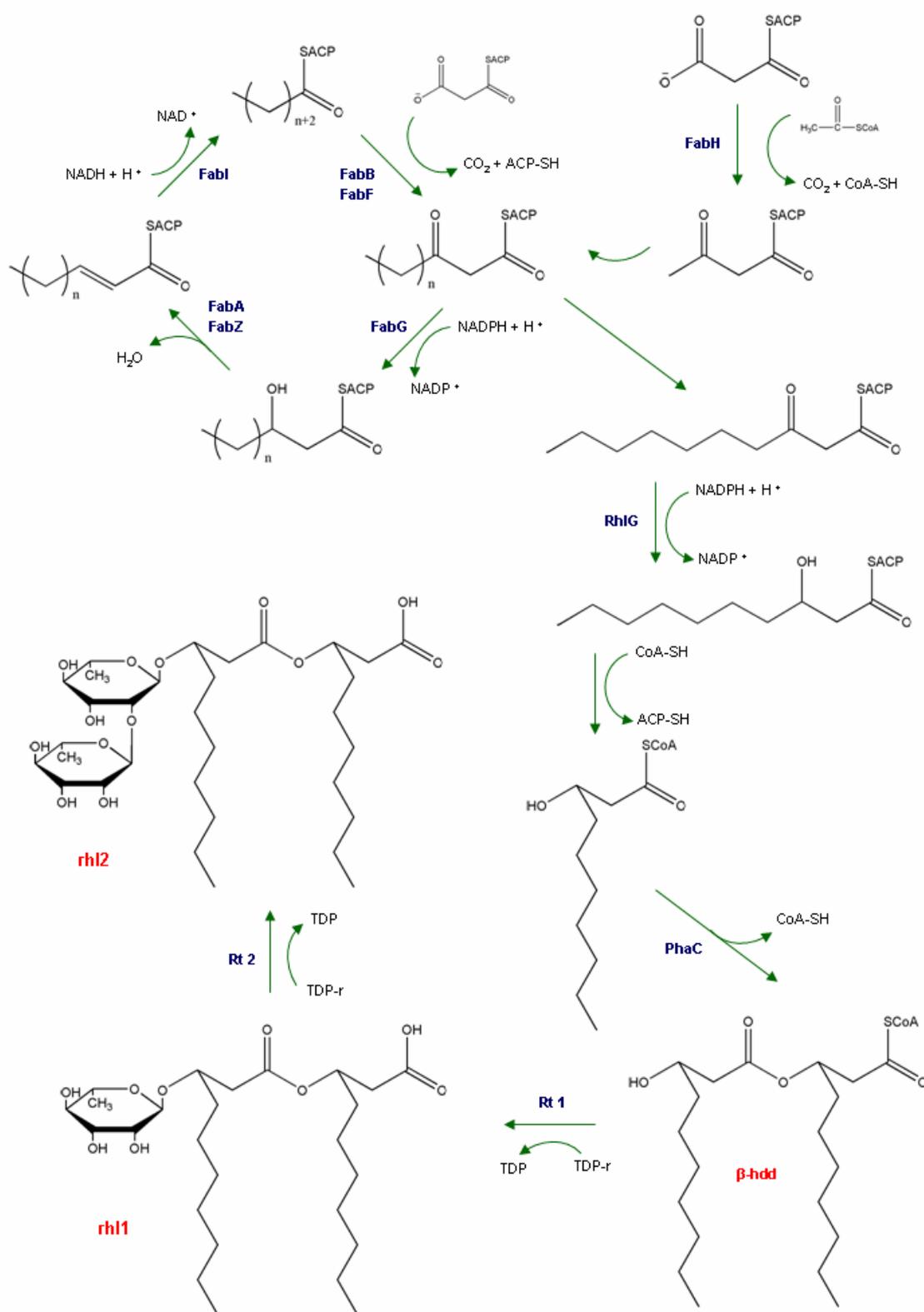


Figura 2.3: Esquema da biossíntese de ácidos graxos associada à produção de rhamnolipídeos (adaptado de CAMPOS-GARCIA *et al.*, 1998).

O ciclo apresentado na Figura 2.3 é catalisado pela enzima FabH, que utiliza acetil-CoA para formar aceto acetil-ACP. Na etapa seguinte, ocorre a condensação de malonil-ACP com acil-ACP, catalisada pelas enzimas FabF e FabB. O β -cetoéster resultante é reduzido a β -hidroxiacil-ACP, com a enzima FabG. A próxima etapa do ciclo é catalisada pelas enzimas FabA ou FabZ, enquanto que a última etapa consiste na conversão do trans-2-enoil-ACP, resultante da etapa anterior, em acil-ACP, pela ação da enzima FabI. A cada volta do ciclo, o composto resultante é alongado em uma unidade acila. Quando o β -hidroxidecanoato é finalmente sintetizado, ele é reduzido pela enzima RhlG, de forma similar à reação catalisada pela enzima FabG, na produção de β -hidroxiácidos. Os β -hidroxiácidos são polimerizados com a Coenzima A ligada a ácidos graxos que atuam como substratos para a enzima PhaC. O β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato produzido serve então como base para a produção no monoramnolípídeo (CAMPOS-GARCIA *et al.*, 1998). A biossíntese de L-ramnose toma como precursores a glicose, na forma de glicose-6-fosfato, ou o glicerol, na forma de manose-6-fosfato (SANTOS, 2003).

2.3. Contactores Gás/Líquido

O objetivo primário das operações de transferência de massa é colocar duas fases em contato para a eficiente transferência de uma ou mais espécies entre elas. As taxas de transferência de cada componente são afetadas diretamente pela a área de contato estabelecida entre as fases e pelos coeficientes de transferência de massa das espécies em cada fase (KOVVALI e SIRKAR, 2003). Operações de contato gás/líquido e líquido/líquido são tradicionalmente realizadas em algum recipiente funcionando como uma coluna de simples estágio ou multiestágios com as fases circulando em contracorrente (WINSTON e SIRKAR, 1992). Normalmente, o maior desafio em relação ao projeto e à operação dos equipamentos para este fim é maximizar a transferência de massa através do aumento da área de contato entre as fases. Em colunas empacotadas, por exemplo, isso implica em uma criteriosa seleção do material utilizado como recheio e na distribuição uniforme dos fluidos. Em outros equipamentos, o desafio recai em minimizar o tamanho e maximizar o número de bolhas/gotas da fase dispersa.

O fato das fases estarem diretamente em contato causa alguns problemas, como a formação de emulsões e espumas. Uma tecnologia alternativa que evita estes problemas e ainda oferece substancialmente mais área interfacial é o contato das fases através de uma membrana (GABELMAN e HWANG, 1999).

Um contactor de membrana é um artefato que propicia a transferência de massa entre duas fases fluidas sem a dispersão de uma fase em outra. Essa transferência é obtida através do escoamento dos fluidos em lados opostos de uma membrana microporosa ou densa, e ocorre pela difusão através da interface, como em um equipamento tradicional. Em um contactor de membrana, a separação por membranas está completamente integrada com outras tecnologias de separação, como a extração ou a absorção. Membranas oferecem a possibilidade de se ter um equipamento com grande eficiência energética, além de ser um processo modular, facilitando seu escalonamento. Já a extração ou a absorção oferecem alta seletividade e altas forças motrizes para o transporte, mesmo quando operadas em condições de baixas concentrações (KLAASSEN *et al.*, 2003).

Os contactores de membrana ainda apresentam valores bem maiores para os coeficientes volumétricos de transferência de massa, se comparados aos equipamentos tradicionais, e também uma faixa mais ampla para os valores possíveis de fluxo. Novas aplicações de membranas como contactores de fases estão sendo rapidamente desenvolvidas em diversos setores. Como a variedade de aplicações se expande, a demanda por materiais adequados às novas necessidades também aumenta. Para algumas aplicações, a superfície da membrana é modificada para atender às condições químicas e hidrodinâmicas impostas. A formação de uma fina camada de um novo material sobre a membrana é investigada para aumentar a estabilidade da interface entre as fases ou para fornecer resistência química ou resistência à formação de incrustações ou bloqueamento de poros (“*fouling*”) (KOVVALI e SIRKAR, 2003).

Operações com contactores gás/líquido são usados em diversos setores, com variadas aplicações, como a gaseificação/degaseificação de líquidos, a absorção/dessorção de vapores, entre outras. Esses processos utilizam normalmente

membranas microporosas hidrofóbicas na forma de fibras-ocas, que, quando em operação, apresentam seus poros preenchidos com gás/vapor. Durante a operação, uma mistura gasosa escoar em um dos lados da membrana a uma pressão menor ou igual à da fase aquosa, que escoar pelo outro lado da membrana. Um fator de grande importância na boa operação de um contactor gás/líquido é a resistência à intrusão nos poros da membrana, mesmo a um alto valor para a diferença de pressão entre as fases envolvidas, evitando que haja a dispersão da fase líquida, garantindo a força motriz para a transferência de massa. Isto é alcançado através do controle da distribuição de tamanho de poro da membrana. A equação de Young-Laplace mostra que pequenos poros levam a um alto valor da pressão necessária para a intrusão de líquido na membrana. Assim, contactores utilizando membranas que apresentam distribuição uniforme de pequenos poros podem ser operados com grande diferença de pressão entre as fases (KOVVALI e SIRKAR, 2003).

Com a interface imobilizada na entrada dos poros, uma ou mais espécies gasosas podem ser absorvidas na fase líquida ou retiradas desta. Essa operação não-dispersiva do contactor de membrana apresenta vários benefícios. As vazões das correntes gasosa e líquida podem ser variadas de forma independente, sem os inconvenientes característicos dos contactores baseados na dispersão das fases, como a formação excessiva de espumas e o transbordamento de colunas. A área interfacial é conhecida a partir dos valores da área e da porosidade superficial da membrana. Nesse tipo de contactor, a membrana microporosa atua como uma barreira de fases, prevenindo a fase líquida de entrar nos poros que contém a fase gasosa e também prevenindo o aparecimento de bolhas na fase líquida. A membrana não atua como uma barreira seletiva de espécies, mas sim como uma imobilizadora da interface gás/líquido (KOVVALI e SIRKAR, 2003).

O uso de membranas na forma de fibras-ocas como contactores leva a uma grande diminuição do volume total dos equipamentos utilizados. Outra vantagem é a disponibilidade do valor da área de contato. Assim, os coeficientes volumétricos de transferência de massa (K_{La}) podem ser diretamente convertidos nos coeficientes tradicionais de transferência de massa (K_L), o que não acontece nos equipamentos para

contatos dispersivos tradicionais sem um grande esforço para a determinação da distribuição de tamanhos de bolhas ou gotas.

Contactores de membrana podem ser aplicados em quase todos os sistemas que apresentam operações convencionais de absorção ou dessorção de gases. Mas normalmente eles são utilizados em processos com soluções aquosas ou orgânicas que não molham a membrana, ou seja, quando seus poros se apresentam preenchidos com a fase gasosa. Isso diminui a resistência ao transporte na membrana (KREULEN *et al.*, 1993).

Outra possibilidade é o uso de membranas cobertas com uma fina camada superficial. Essa membrana coberta não necessita do controle da diferença de pressão entre as fases para garantir a imobilização da interface. A presença dessa camada superficial representa uma resistência extra ao transporte, mas se o gás a ser transportado apresentar grande afinidade com o material da superfície e essa camada for realmente fina, o coeficiente global de transferência de massa pode não ser muito afetado (KEMPERMAN, 1995).

Na literatura, vários estudos de contactores gás/líquido estão apresentados. A maioria apresenta uma modelagem simplificada do processo de absorção ou dessorção e sua comparação com dados experimentais (NII e TAKEUSHI, 1994, KIM e YANG, 2000, TAI *et al.*, 1994, KREULEN *et al.*, 1993). Essa modelagem é normalmente feita utilizando-se a definição de coeficientes de transferência de massa ou o balanço de massa, mas nesse caso, as equações são normalmente simplificadas e resolvidas numericamente. AHMED e SEMMENS (1996) estudaram o uso de módulos de fluxo transversal à direção axial das fibras para aeração, também comparando valores preditos através de correlações para os coeficientes de transferência de massa e valores observados experimentalmente. QI e CUSSLER (1985a, 1985b) compararam o desempenho de contactores para a absorção de gás com o estimado para colunas convencionais. Apesar desses vários estudos, não foram encontrados trabalhos completos referentes ao comportamento de sistemas de aeração com a variação de

condições operacionais. Um esquema simplificado de um contactor gás/líquido é apresentado na Figura 2.4.

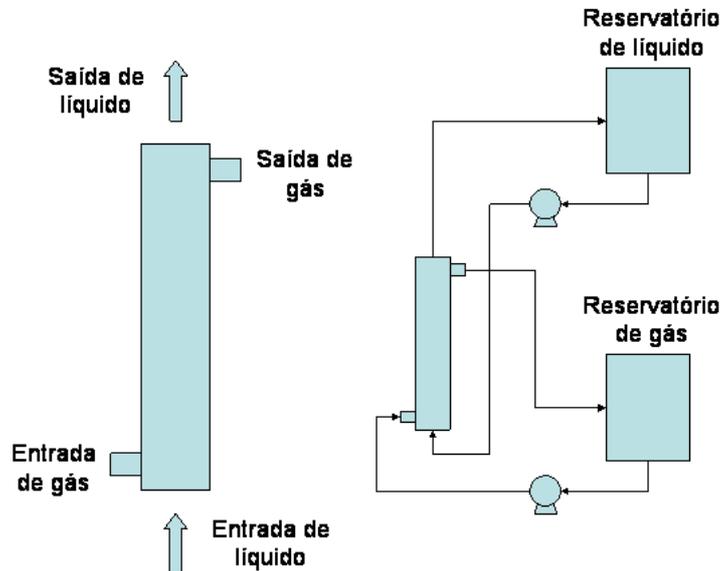


Figura 2.4: Esquema de um contactor gás/líquido

2.3.1. Equacionamento do Processo de Transferência de Massa

Para os cálculos e avaliações necessários de um sistema de oxigenação, foram implementadas rotinas no programa *MathCad*[®] (MathCad 2000 Professional – MathSoft, Inc.) para cada situação em estudo: escoamento de líquido pela parte externa das fibras, escoamento pelo interior de fibras microporosas e pelo interior de fibras compostas.

Esta simulação foi realizada para a avaliação do efeito das principais variáveis, como o tipo de membrana, a pressão parcial de oxigênio na corrente gasosa, a vazão da corrente líquida, a área de membrana, os coeficientes de transferência de massa envolvidos no processo e a capacidade de oxigenação de um contactor previamente definido. As informações obtidas foram úteis na identificação de quais as variáveis mais relevantes para o processo e para a definição das condições iniciais dos experimentos de oxigenação.

Dois abordagens podem ser consideradas para o equacionamento do processo de transferência de massa em um contactor gás/líquido para a absorção de gases. A primeira utiliza a definição dos coeficientes de transferência de massa e correlações para a sua determinação. A outra é baseada no balanço de massa para o gás ao longo da fibra e na resolução da equação diferencial resultante desse balanço. A primeira abordagem se mostra mais simples matematicamente e será avaliada frente à abordagem mais rigorosa. A seguir, estas duas abordagens serão descritas sucintamente.

a) Coeficientes de transferência de massa

Para a avaliação da área necessária à oxigenação, pode ser utilizada a correlação obtida por VLADISAVLJEVIC (1999), relacionando a área ao coeficiente de transferência de massa na fase líquida, apresentada como Equação 2.1.

$$A = \frac{Q}{K} * \ln \left(\frac{c_{eq} - c}{c_{eq} - c_R} \right) \quad \text{Equação 2.1}$$

Onde A é a área total de troca necessária, Q , a vazão total da corrente líquida, K , o coeficiente global de transferência de massa, e c_{eq} , c , e c_R , a concentração de oxigênio na fase líquida no equilíbrio com o gás, na entrada do aerador e em sua saída, respectivamente. Quando considerado o uso de fibras microporosas, o valor da área efetiva de transferência deve ser corrigido pela porosidade superficial para se obter o valor da área total de membrana. Para determinado número de fibras N , com certo diâmetro interno/externo, d , o comprimento das fibras para atingir uma determinada concentração de gás dissolvido na fase líquida, c_R , é determinado usando as Equações 2.2 e 2.3.

$$A = \pi * d * L * N \quad \text{Equação 2.2}$$

$$L = \frac{1}{\pi * d * N} * \frac{Q}{K} * \ln \left(\frac{c_{eq} - c}{c_{eq} - c_R} \right) \quad \text{Equação 2.3}$$

A concentração de gás na entrada do aerador é considerada constante, enquanto que a concentração de equilíbrio é relacionada com pressão parcial do oxigênio através da constante de Henry. Já a concentração pretendida na saída do aerador é estabelecida a partir de um determinado valor para o coeficiente volumétrico de transferência de massa ($K_L a$), muito utilizado quando se trata de aeradores convencionais, nos quais não se pode estimar facilmente o valor da área interfacial. Para a comparação com o sistema convencional, também é fixado um determinado volume de líquido no aerador convencional (V), além de se considerar a concentração de oxigênio na fase aquosa em equilíbrio com ar a pressão atmosférica (c_{eq}^1). Essa relação está apresentada na Equação 2.4.

$$c_R = c - K_L a * (c_{eq}^1 - c) * \frac{V}{Q} \quad \text{Equação 2.4}$$

Os valores para o coeficiente de transferência de massa são estimados com base em correlações presentes na literatura. No caso da utilização de fibras-ocas microporosas, considera-se o coeficiente global de transferência de massa igual ao coeficiente de transferência na fase líquida. A resistência ao transporte na membrana pode ser desprezada, já que esta se apresenta preenchida com o gás. As correlações utilizadas para a determinação dos coeficientes de transferência de massa na fase líquida (K_L), tanto para o escoamento da corrente líquida pelo interior das fibras quanto pela carcaça do módulo, foram pesquisadas por FUTSELAAR (1996). Essas correlações relacionam o número de Sherwood (Sh) com outros parâmetros, como o número de Reynolds (Re) e o número de Schmidt (Sc), para o escoamento do líquido em regime laminar. O número de Sherwood está diretamente relacionado com o coeficiente de transferência de massa na fase líquida, como mostra a Equação 2.5, onde D é o coeficiente de difusão do gás no líquido. Outros parâmetros estão apresentados nas Equações 2.6, 2.7 e 2.8.

$$Sh = \frac{K_L * d}{D} \quad \text{Equação 2.5}$$

$$Re = \frac{d * v * \rho}{\mu} \quad \text{Equação 2.6}$$

$$Sc = \frac{\mu}{\rho * D} \quad \text{Equação 2.7}$$

$$v = \frac{4 * Q}{N * \pi * d^2} \quad \text{Equação 2.8}$$

Nestas equações, v é a velocidade média de escoamento do líquido e ρ e μ são, respectivamente, a densidade e a viscosidade do líquido. Nas Equações 2.9 e 2.10 são apresentadas, nessa ordem, as correlações para o número de Sherwood para o escoamento laminar de líquido interno e externo às fibras. Para o escoamento externo, o diâmetro d utilizado é o diâmetro hidráulico para o escoamento no módulo e a velocidade é calculada com base nesse diâmetro.

$$Sh = 1,62 * \left(Re * Sc * \frac{d}{L} \right)^{1/3} \quad \text{Equação 2.9}$$

$$Sh = 3,66 + 1,61 * \left(Re * Sc * \frac{d}{L} \right)^{1/3} \quad \text{Equação 2.10}$$

Nas Equações 2.11 e 2.12, são apresentadas as relações finais para os coeficientes de transferência de massa para o escoamento interno e externo. Nestes casos, o diâmetro d corresponde, respectivamente nessas equações, ao diâmetro interno e externo das fibras.

$$K_L = \frac{D}{d} * 1,62 * \left(\frac{4 * Q}{\pi * N * D * L} \right)^{1/3} \quad \text{Equação 2.11}$$

$$K_L = \frac{D}{d} * \left[3,66 + 1,61 * \left(\frac{4 * Q}{\pi * D * L} \right)^{1/3} \right] \quad \text{Equação 2.12}$$

Combinando-se então as Equações 2.11 ou 2.12, dependendo do caso estudado, 2.4 e 2.3, determina-se o comprimento de fibras necessários para atingir o nível especificado de transferência. Assim, com o uso das Equações 2.1 ou 2.2, é obtido o valor da área de troca necessária. Para a obtenção da área total de membrana, o valor da

área de troca, correspondente à área porosa da membrana deve ser corrigido pela porosidade superficial da fibra (área ocupada pelos poros / área total).

Quando são consideradas fibras-ocas cobertas com uma pele densa, o coeficiente global de transferência de massa é obtido como uma soma das resistências ao transporte na fase líquida e na pele densa (Equação 2.13) (HINES e MADDOX, 1985). Essa soma é ponderada pelo coeficiente de partição do oxigênio entre a membrana e a fase aquosa (m) definido como na Equação 2.14. A resistência ao transporte na pele (K_P , coeficiente de transferência de oxigênio na camada densa) é definida como a razão entre o coeficiente de difusão do gás no material da pele (D_2) e a sua espessura (l) (Equação 2.15).

$$\frac{1}{K} = \frac{1}{m * K_P} + \frac{1}{K_L} \quad \text{Equação 2.13}$$

$$m = \frac{C_{eq}^{pele}}{C_{eq}^{líquido}} \quad \text{Equação 2.14}$$

$$K_P = \frac{D_2}{l} \quad \text{Equação 2.15}$$

O uso da Equação 2.13 para a determinação do coeficiente global de transferência implica no uso das concentrações de oxigênio dissolvido relativas à fase líquida, ou seja, a concentração de oxigênio dissolvida na pele da membrana, em equilíbrio com a fase gasosa, deve ser convertida para um valor equivalente de concentração de oxigênio dissolvido na água (c^*), pela sua divisão pelo coeficiente de partição m .

O procedimento para a obtenção do valor da área é o mesmo do caso anterior (fibras microporosas), mas nesse caso a área de membrana é igual à área de troca necessária, pois, devido à presença de uma pele densa, toda a extensão da fibra está disponível ao contato com a fase líquida (GABELMAN e HWANG, 1999).

b) Balanço de massa

Através do balanço infinitesimal de massa para o oxigênio na fase líquida, no interior da fibra, considerando o fluxo de oxigênio na direção axial predominantemente convectivo e o fluxo radial predominantemente difusivo, obtém-se a seguinte equação diferencial e condições de contorno e inicial:

$$\left. \begin{aligned} \frac{1}{r} * \frac{\partial}{\partial r} \left(r * D * \frac{\partial c}{\partial r} \right) &= v * \frac{\partial c}{\partial z} \\ z = 0 &\Rightarrow c = c_0 \\ r = 0 &\Rightarrow \frac{\partial c}{\partial r} = 0 \\ r = R &\Rightarrow -\frac{\partial c}{\partial r} = \frac{K_P * m}{D} * (c - c^*) \end{aligned} \right\} \text{Equação 2.16}$$

Na Equação 2.16, r é a direção radial a partir do centro da fibra e z , a direção axial, com seu zero no início do aerador. A concentração de oxigênio c_0 é a concentração na corrente de entrada das fibras e R é o raio interno das mesmas. A solução para esta equação diferencial, considerando constante a velocidade do fluido ao longo do raio, é apresentada na Equação 2.17, com o parâmetro α definido na Equação 2.18. Na solução, o parâmetro β é obtido na resolução da Equação 2.19, com J_0 e J_1 sendo as funções de Bessel de ordem zero e um, respectivamente (HINES e MADDOX, 1985).

$$\frac{c - c^*}{c_0 - c^*} = \sum_{i=1}^{\infty} \frac{2 * \alpha * J_0 \left(\beta_n * \frac{r}{R} \right)}{\left(\beta_n^2 + \alpha^2 \right) * J_0(\beta_n)} * \exp \left(\frac{-\beta_n^2 * D * z}{v * R^2} \right) \quad \text{Equação 2.17}$$

$$\alpha = \frac{K_P * R * m}{D} \quad \text{Equação 2.18}$$

$$\beta_n * J_1(\beta_n) - \alpha * J_0(\beta_n) = 0 \quad \text{Equação 2.19}$$

Como solução da equação, é obtido o perfil radial de concentração de oxigênio dissolvido ao longo da fibra. Para se determinar a quantidade de gás transferida por

área, em função da posição axial, utiliza-se a Equação 2.20, que corresponde à primeira Lei de Fick.

$$J(r = R) = -D * \left. \frac{\partial c}{\partial r} \right|_{r=R} \quad \text{Equação 2.20}$$

Calculando-se o valor da integral, ao longo do comprimento de fibra L , da expressão obtida para o fluxo, J , multiplicada por um valor diferencial de área, $N*2*\pi*R*dz$, é possível a obtenção do valor da quantidade de gás transferida por tempo. Quando o objetivo é a determinação da área de troca necessária para se transferir determinada quantidade de gás, o processo empregado é o inverso – a partir de determinada quantidade de gás a ser transferida, especificada através do valor do coeficiente volumétrico de transferência de massa ($K_L a$), calcula-se o valor necessário para o comprimento das fibras, obtendo-se assim o valor da área. Essa quantidade de gás transferida é definida na Equação 2.21.

$$Q_t = K_L a * V * (c_{eq}^1 - c) \quad \text{Equação 2.21}$$

Nos casos onde se considera o escoamento de líquido interno às fibras, ainda podem ser contemplados cálculos da queda de pressão ao longo do contactor. Esses cálculos são realizados com o uso da Equação 2.22, derivada da equação da energia mecânica.

$$p_E - p_S = \frac{1}{2} * \rho * v^2 * \left(k + f_D * \frac{L}{d} \right) \quad \text{Equação 2.22}$$

Nessa equação, p_E e p_S representam, respectivamente, as pressões do líquido na entrada e na saída do módulo, k representa a perda de carga relativa à entrada de líquido nas fibras e f_D é o fator de atrito de Darcy. Nas situações encontradas neste trabalho, k apresenta valor de 0,5 e f_D pode ser considerado constante e igual a 0,02, para um tubo liso (PERRY e CHILTON, 1973).

3. Materiais e Métodos

Neste capítulo, são apresentados os materiais utilizados para o desenvolvimento do presente trabalho e as metodologias empregadas. São descritas as técnicas utilizadas para a condução e para o acompanhamento das fermentações, realizadas no Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM, Instituto de Química/UFRJ). Também são apresentadas as técnicas de caracterização das membranas e dos contactores utilizados, realizada no Laboratório de Processos com Membranas (PAM, Programa de Engenharia Química – COPPE/UFRJ).

A lista com os principais produtos químicos utilizados na realização dos experimentos é apresentada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Materiais utilizados na realização dos experimentos

Item utilizado	Fabricante
Glicerol	Vetec
NaNO ₃	Reagen
K ₂ HPO ₄	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
MgSO ₄	Reagen
Peptona	Difco
Extrato de levedura	Isolar
Dextrose	Merck
Agar	Merck
NaClO	Vetec
Silicone RTV A e B	General Electric
Iso-octano	Vetec

3.1. Produção de Rhamnolipídeos

3.1.1. Manutenção de Microorganismo e Preparo do Pré-inóculo

A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PA1 previamente selecionada de ambientes de petróleo como melhor produtora de biossurfactantes (SANTA ANNA, 2000) foi preservada em glicerol a 10% em ultrafreezer a -80 °C. O pré-inóculo foi crescido em

placa com YPDA (extrato de levedura 0,3%, peptona 1,5%, dextrose 0,1%, agar 1,2%) a 30 °C por 48 horas e transferido para frascos de 1000 ml com 300 ml de meio com a seguinte composição (g/L): NaNO₃ 1,0; KH₂PO₄ 3,0; K₂HPO₄ 7,0; MgSO₄.7H₂O 0,2 ; extrato de levedura 5,0; peptona 5,0 e glicerol P.A. 30,0. Após 24 horas de cultivo, o meio de fermentação contendo as células foi estocado em criotubos na relação glicerol/meio fermentado de 1:3 para servir como pré-inóculo padrão em todas as fermentações.

3.1.2. Preparo do Inóculo

O conteúdo de 1,0 ml do criotubo foi inoculado em 300ml de meio de fermentação com a seguinte composição (g/L): glicerol 30,0; NaNO₃ 1,0; K₂HPO₄ 7,0; KH₂PO₄ 3,0; MgSO₄.7H₂O 0,2; extrato de levedura 5,0 e peptona 5,0. Os frascos foram então incubados em agitadores rotatórios a 30°C e 170 rpm por 40 horas. Ao final desse período, as células de cada frasco foram recuperadas por centrifugação (5000g por 20 minutos) e utilizadas como inóculo nos biorreatores.

3.1.3. Esterilização

O fermentador, já com o meio de cultura a ser utilizado, era esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos antes de cada produção. O sistema de oxigenação era esterilizado com a circulação de uma solução de hipoclorito de sódio a 1,0 % por 1 hora. Depois deste procedimento, era circulada água destilada estéril pelo sistema para a eliminação de vestígios de cloro. Só então era realizada a inoculação dos microorganismos.

3.1.4. Produção de Ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1

O meio de cultura utilizado nas fermentações apresentava a seguinte composição em gramas por litro: glicerol 30,0; NaNO₃ 1,4; K₂HPO₄ 7,0; KH₂PO₄ 3,0 e MgSO₄.7H₂O 0,2, resultando em uma relação carbono/nitrogênio igual a 60 (SANTOS, 2003).

As fermentações principais foram realizadas em um biorreator BioFlo IIc (Batch/Continuous Fermentor; New Brunswick Scientific; USA) com capacidade nominal de 5,0 litros de volume, inserido em uma capela com exaustão. O volume útil médio utilizado nas fermentações foi de 3,0 litros, a temperatura foi mantida em 30°C e a agitação, em 100 rpm. A oxigenação foi conduzida de forma não dispersiva através de um contactor gás/líquido. O sistema utilizado pode ser visto nas Figuras 3.1 e 3.2.

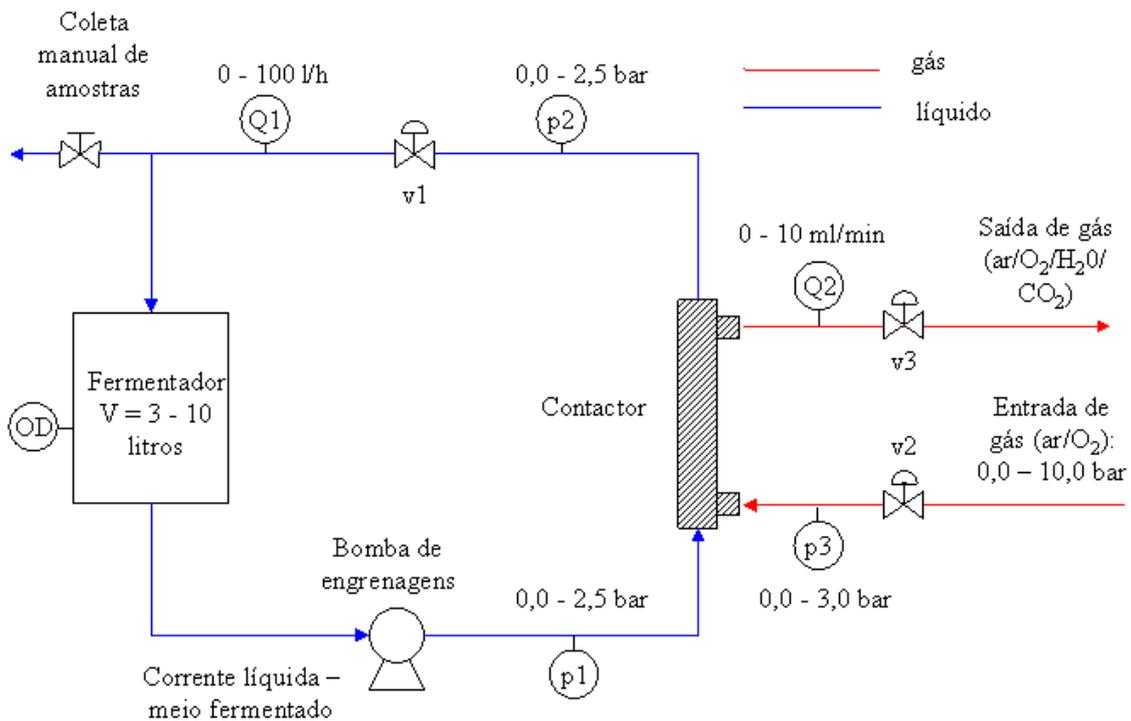


Figura 3.1: Fluxograma simplificado do sistema de oxigenação.

A oxigenação foi realizada com ar comprimido ou com o auxílio de um cilindro de oxigênio puro. As condições de oxigenação foram inicialmente definidas de acordo com os resultados dos testes de oxigenação do módulo utilizado.

A metodologia para o acompanhamento das variáveis mais relevantes é apresentada nos itens seguintes. As curvas de calibração utilizadas estão apresentadas no Anexo 1.



Figura 3.2: Fotografia do fermentador inserido na capela de exaustão acoplado ao sistema de oxigenação utilizando o contactor de membranas

Também foram conduzidas fermentações em frascos agitados para efeito comparativo com o novo sistema proposto. A temperatura da fermentação foi mantida em 30,0 °C e a agitação, em 170 rpm, em um agitador rotatório (C25KC Incubator Shaker, New Brunswick Scientific).

3.1.5. Controle da Concentração de Oxigênio no Biorreator

O sistema de controle da concentração de oxigênio dissolvido foi projetado e construído em parceria com a empresa Yukon Automação e Sistemas, utilizando-se um Controlador Lógico Programável (CLP OCS, GE Fanuc). Outro sistema de controle da concentração de oxigênio dissolvido foi desenvolvido previamente por SABRA *et al.* (2000), mas a oxigenação era realizada de forma dispersiva por borbulhamento de uma mistura dos gases nitrogênio e oxigênio. Assim, além de persistir o problema da formação de espumas, havia perda de oxigênio, sendo extremamente complexa a determinação da exata quantidade consumida deste nutriente. Uma malha simplificada de controle foi implementada neste controlador com a função de manter a concentração de oxigênio dissolvido no meio constante ao longo da fermentação. Isto foi conseguido

igualando-se a taxa de fornecimento de oxigênio à taxa de consumo deste nutriente pelas bactérias. Na Figura 3.3 estão apresentadas fotos do CLP e de seu painel elétrico.



Figura 3.3: Controlador Lógico Programável utilizado para implementação de uma malha de controle da concentração de oxigênio dissolvido nas fermentações para a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*.

Pela experiência adquirida através da condução dos experimentos com o controle manual da oxigenação, a estratégia de controle foi baseada primeiramente na alteração da vazão da corrente líquida e, posteriormente, a pressão da corrente gasosa para controlar a taxa de fornecimento de oxigênio. Essa taxa é diretamente proporcional às duas variáveis citadas. Assim, se o valor da concentração de oxigênio dissolvido fosse reduzido para um valor abaixo do desejado, a taxa de fornecimento deveria ser elevada pelo aumento na vazão da corrente líquida e, se insuficiente, na pressão da corrente

gasosa. Se a concentração de oxigênio estivesse acima do estabelecido, a taxa deveria ser reduzida.

Como observado na Figura 3.1, a vazão da corrente líquida era controlada através da atuação sobre a bomba de engrenagens e sobre a válvula v1. Já a pressão da corrente de alimentação de oxigênio era controlada pela atuação sobre as válvulas de entrada e saída do contactor, v2 e v3, respectivamente. Assim, a única entrada do CLP se refere à concentração de oxigênio dissolvido medida no meio de fermentação, enquanto que as saídas são quatro – para a bomba e as válvulas.

Os dados de operação do controlador eram repassados a um computador acoplado ao sistema através de um programa supervisorio (IFix StandAlone Standard HMI Pack RunTime para 75 pontos). Esses dados eram armazenados para análise posterior.

3.1.6. Determinação da Concentração de Células

A concentração celular das suspensões de *Pseudomonas aeruginosa* PA1 foi determinada através da absorbância de luz a 600 nm (Espectrofotômetro MultiSpec – 1501; Shimadzu Corporation, Japan). O valor de absorbância foi convertido no valor de concentração (g/L) através de uma curva de calibração. Esta curva foi construída por amostragem ao final da fermentação. As amostras foram filtradas em membranas de 0,2 µm para a retirada das células e estas foram levadas em estufa a 70 °C até que fosse atingido massa constante. A curva de calibração da absorbância em função da massa seca foi construída a partir de uma série de diluições realizadas com amostras idênticas de meio de cultivo contendo células. Para cada diluição os valores de absorbância e massa seca foram determinados e construiu-se assim uma curva de calibração (Anexo 1). O fator de conversão de absorbância em concentração, calculado através da equação $Abs = 2,5437 * X$, foi de 0,39 g/L ($= 1 / 2,5437$).

3.1.7. Quantificação de Glicerol

O teor de glicerol nas amostras livres de células – as células foram removidas das amostras por centrifugação a 5000g por 15 min – foi avaliado pelo método enzimático/colorimétrico para determinação de triglicerídeos (Triglicérides Enzimático – Bioclin; Quibasa química Básica Ltda.). O método consiste na fosforilação de glicerol a glicerol-3-fosfato em presença de glicerol quinase e ATP. O glicerol-3-fosfato é então oxidado pela glicerol-3-fosfato oxidase, liberando peróxido de hidrogênio que, na presença de aminoantipirina, p-clorofenol e peroxidase, dá origem a um composto quinônico de cor cereja. A intensidade dessa coloração pode ser determinada pela medida de absorvância no comprimento de onda correspondente – 490 nm – e é proporcional à concentração de glicerol, podendo assim ser comparada a um padrão.

3.1.8. Quantificação de Ramnolipídeos

A quantificação dos ramnolipídeos foi realizada de modo indireto, utilizando-se a ramnose como referência – a ramnose é um subproduto da hidrólise ácida dos ramnolipídeos. Foi utilizado um método adaptado do descrito por PHAM *et al.* (2004), onde a etapa de extração dos ramnolipídeos foi suprimida, sendo o ensaio realizado diretamente a partir do meio fermentado livre de células, já que o biossurfactante é um produto extracelular. Para a determinação da concentração de ramnose presente na amostra, o valor de absorvância obtido era comparado com o valor obtido na dosagem de uma solução padrão de ramnose.

A solução de biossurfactantes produzida pela cepa PA1 de *Pseudomonas aeruginosa* foi caracterizada por HPLC e comparada a cromatogramas obtidos na literatura (SANTA ANNA, 2005). A composição de ramnolipídeos desta solução está apresentada na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Composição de uma solução de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1.

Tipo	Fórmula	Massa molar (g/gmol)	Concentração mássica (%)
R1 (MonoC10C10)	C ₂₆ H ₃₆ O ₉	492	35,3
R2 (Di C10C10)	C ₃₂ H ₄₆ O ₁₃	638	51,0
DiC10C12	C ₃₄ H ₅₀ O ₁₃	666	9,8
DiC10C8	C ₃₀ H ₄₂ O ₁₃	610	3,9

Tomando como base 100,0 g de ramnolipídeos, temos um total de 0,2737 gmol de ramnose. Sabendo-se que a massa molar da ramnose (C₆H₁₂O₅) é igual a 164,0 g/gmol, calculamos um total de 44,89 g de ramnose. Com isso, é determinado o fator de 2,23 (100,0 g de ramnolipídeos/44,89 g de ramnose) para a conversão de concentração de ramnose em concentração total de ramnolipídeos.

3.1.9. Quantificação de Nitrato

A concentração do nitrato foi determinada através da reação colorimétrica desse íon com sulfato de brucina. 2,0 ml de solução de sulfato de brucina a 0,6 g/L em ácido sulfúrico 80% foram adicionados em 0,5 ml de amostra sem células. A reação foi conduzida a 100 °C por 15 minutos, sendo então paralisada por resfriamento em banho de gelo. Os valores de absorvância foram lidos para um comprimento de onda de 410 nm e convertidos para valores em mg/L com o uso da curva de calibração $Abs = 0,0469 * C$, com C igual a concentração de nitrato, em mg/L (ACS COMMITTEE ON ANALYTICAL REAGENTS, 2006).

3.2. Contactores Gás/Líquido

Para a melhor compreensão das variáveis envolvidas no processo de oxigenação com o uso de um contactor gás/líquido, foram realizadas a modelagem e a simulação de um oxigenador. Os resultados obtidos na simulação podem ser úteis na indicação das características do oxigenador necessárias para atender a determinada finalidade.

3.2.1. Modelagem e Simulação do Oxigenador

Para os cálculos e avaliações necessários, com o equacionamento descrito anteriormente, foram implementadas rotinas no programa *MathCad*[®] (MathCad 2000 Professional – MathSoft, Inc.) para cada situação em estudo: escoamento de líquido pela parte externa das fibras, escoamento pelo interior de fibras microporosas e pelo interior de fibras compostas, este último considerando tanto a abordagem de coeficientes de transferência de massa quanto a do balanço de massa para o oxigênio. As rotinas são encontradas no Anexo 2.

Os parâmetros invariáveis utilizados nos cálculos são apresentados na Tabela 3.3. Todos os cálculos foram realizados para a transferência de oxigênio para a água. A concentração de oxigênio na corrente de entrada do aerador foi definida como sendo 50 % do valor de saturação.

Tabela 3.3: Parâmetros utilizados na simulação

Parâmetro	Descrição	Valor	Unidade
c_0	Concentração de oxigênio na corrente de entrada do aerador	4	g/m^3
H	Constante de Henry, a 25,0 °C (*)	$4,4 \cdot 10^4$	atm
c_{eq}^1	Concentração de oxigênio na água em equilíbrio com o ar a pressão de 1,0 atm e a 25,0 °C	8,1	g/m^3
m	Coefficiente de partição do oxigênio entre silicone/água (**)	4,5	-
V	Volume do aerador convencional	0,01	m^3
d	Diâmetro interno das fibras	0,001	m
D	Coefficiente de difusão do oxigênio em água (fase líquida) (*)	$2,5 \cdot 10^{-9}$	m^2/s
D_2	Coefficiente de difusão do oxigênio em silicone (**)	$2,5 \cdot 10^{-9}$	m^2/s

(*) PERRY e CHILTON, 1973. (**) VAN KREVELEN, 1990.

Para a avaliação do comportamento do sistema com algumas variáveis, as outras eram mantidas fixas em determinados valores, apresentados na Tabela 3.4. Estes valores também foram utilizados nas rotinas encontradas no Anexo 2. O valor do coeficiente volumétrico de transferência de massa foi definido como 10 h^{-1} por ser um valor normalmente utilizado em fermentações para a produção de biossurfactantes.

Na resolução da equação diferencial encontrada no balanço de massa para a fibra-oça composta, a solução é função dos parâmetros β_n . Esses parâmetros são as raízes de uma equação transcendental (Equação 2.19). Essas raízes são função do parâmetro α . Neste trabalho, foram utilizados 11 diferentes valores para β_n . Para cada um destes valores, foi ajustada uma curva em função de α . Os valores das raízes e suas curvas ajustadas estão no Anexo 3.

Tabela 3.4: Variáveis utilizadas na simulação

Parâmetro	Descrição	Valor	Unidade
p_{O_2}	Pressão parcial de oxigênio na corrente gasosa	0,4	atm
K_{La}	Coefficiente volumétrico de transferência de massa	10	h^{-1}
N	Número de fibras	200	-
Q_1	Vazão de líquido por fibra	$0,2 \cdot 10^{-6}$	m^3/s
ε	Porosidade superficial	20%	-
l	Espessura da camada superficial densa	50	μm

3.2.2. Caracterização das Membranas Utilizadas

Foram avaliados alguns tipos de membranas na forma de fibras ocas: microporosas simples e composta com uma camada superficial densa, além de fibras densas de silicone. O principal objetivo foi a comparação das condições de oxigenação e operação destas membranas, bem como a verificação da viabilidade de sua utilização na oxigenação de correntes com baixos valores de tensão superficial, como aquelas provenientes de meios de cultivo na produção de biossurfactantes. Para tanto, essas membranas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (JEOL JSM-5300 Scanning Electron Microscope) e através de testes de permeação de gases e de oxigenação de correntes líquidas. As principais características das membranas utilizadas são apresentadas a seguir, nas Tabelas 3.5, para as fibras microporosas simples, e 3.6, para as fibras compostas com silicone. Na Figura 3.4 é apresentada a foto do módulo comercial contendo as fibras microporosas simples. As fotomicrografias das fibras comerciais compostas estão apresentadas na Figura 3.5. Na Figura 3.6 é apresentada

uma fotomicrografia da seção transversal da fibra densa de silicone utilizada, enquanto que na Tabela 3.7 são apresentadas algumas características indicadas pelo seu fabricante.

Tabela 3.5: Características das fibras e do módulo com membranas microporosas. Módulo comercial FiberFlo[®] produzido por Minntech Co. (EUA) (dados fornecidos pelo fabricante).

Fibras	Diâmetro interno	0,22 mm
	Diâmetro externo	0,26 mm
	Tamanho médio de poro	0,03 μm
	Material	poli(propileno)
Módulo	Área útil	0,6 m ²
	Número de fibras	~ 7000

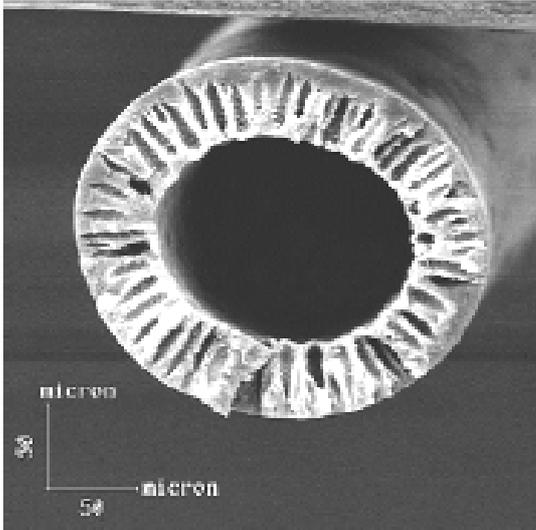


Figura 3.4: Fotografia do módulo comercial com membranas microporosas.

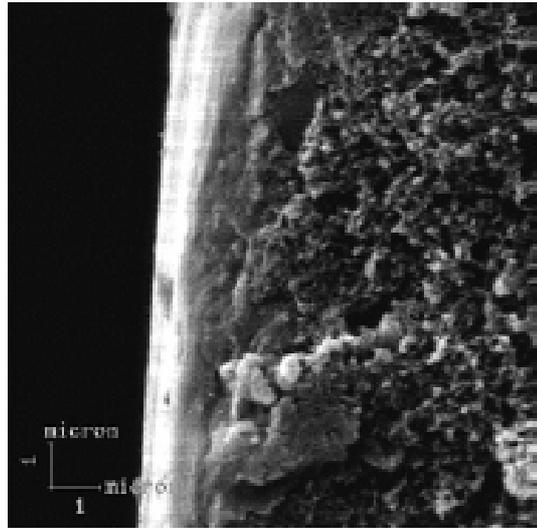
Tabela 3.6: Fibras compostas comerciais. Membranas compostas com pele densa interna de silicone: fabricadas por Innovative Membrane Systems, Inc. / Praxair Co. (EUA) (dados fornecidos pelo fabricante).

Diâmetro interno	0,13 mm
Diâmetro externo	0,22 mm
Material da camada superficial densa	Poli(dimetil siloxano)
Material do suporte poroso	Poli(sulfona)

a) 350 X



b) 10.000 X



c) 2.000 X

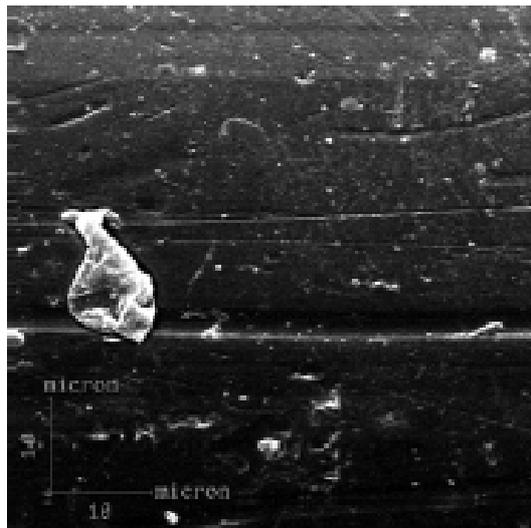


Figura 3.5: Fotomicrografias da fibra microporosa composta – com silicone. a) Seção transversal; b) Detalhes da seção transversal próximo à superfície; c) Superfície externa.

Tabela 3.7: Fibras densas comerciais de Poli(dimetil siloxano): fabricadas por POMP Produtos Hospitalares e Segurança do Trabalho Ltda. (Brasil) (dados fornecidos pelo fabricante).

Diâmetro interno	0,59 mm
Diâmetro externo	0,99 mm
Material da fibra	Poli(dimetil siloxano)

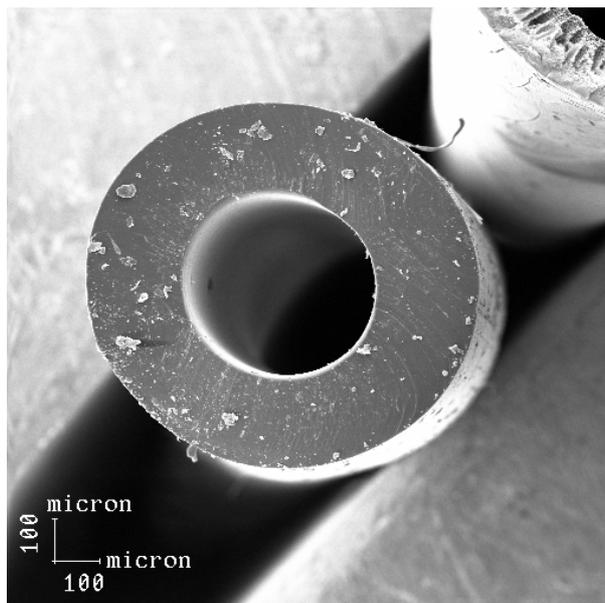


Figura 3.6: Fotomicrografia da seção transversal da fibra comercial densa de silicone.

Preparo de membranas compostas

Dois tipos de módulos de oxigenação contendo fibras compostas foram contemplados no presente trabalho. A primeira opção recaiu no cobrimento das fibras microporosas do módulo comercial FiberFlo com uma fina camada densa de poli(dimetil siloxano), PDMS. Essa opção renderia um módulo com grande área disponível para a transferência de oxigênio, porém compacto. A outra seria a construção de novos módulos utilizando as fibras compostas comerciais.

Os módulos comerciais com membranas microporosas (Figura 3.4) foram submetidos a um procedimento de recobrimento com poli(dimetil siloxano) – silicone – visando obter membranas compostas para utilização na oxigenação do meio fermentado. O procedimento adotado é descrito a seguir (FUTSELAAR, 1996). Foi preparada uma solução a 10,0% (m/m) em iso-octano do pré-polímero a ser utilizado, silicone RTV 610 A e B. A reação de pré-reticulação é conduzida a 40°C por 4 horas. Seguiu-se então a diluição com iso-octano para 5,0% (m/m) e a redução da temperatura da solução para 0°C. Esta solução era então forçada a escoar em contato com a superfície interna das fibras através de uma bomba peristáltica. A evaporação do solvente era então realizada

de forma lenta e controlada, seguida da etapa de reticulação do silicone a 60°C por 4 horas.

O procedimento de cobrimento foi adotado diversas vezes até a obtenção de uma camada densa isenta de defeitos. Após cada operação de cobrimento, o módulo era caracterizado através da permeação de gases, determinando-se a seletividade ao oxigênio em comparação ao nitrogênio. Quando a seletividade atingisse valores acima de 2,0, característico do silicone, poderia se afirmar que estava formada uma camada superficial desse material interna às fibras isenta de defeitos.

Preparo do módulo com membranas comerciais

As fibras ocas compostas comerciais foram utilizadas no preparo de contactores gás/líquido para a oxigenação de correntes líquidas. Exemplos dos módulos construídos estão apresentados na Figura 3.7. Os valores da área efetiva dos módulos puderam ser determinados através da comparação dos valores de permeabilidade gasosa destes com os dados obtidos na caracterização das fibras.

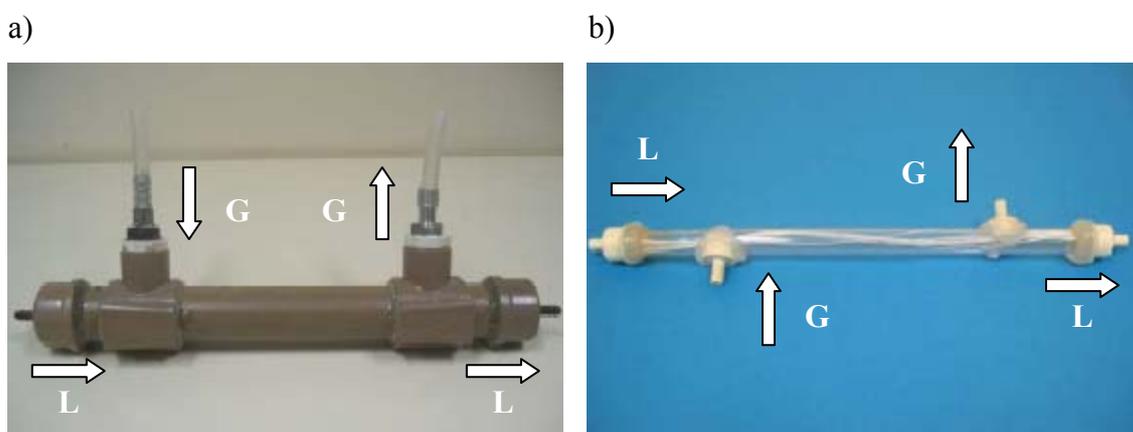


Figura 3.7: Módulos com fibras ocas compostas comerciais. a) módulo com 1500 fibras utilizado na oxigenação durante as fermentações. b) módulo com 16 fibras utilizado nos testes iniciais. L – corrente líquida. G – corrente gasosa.

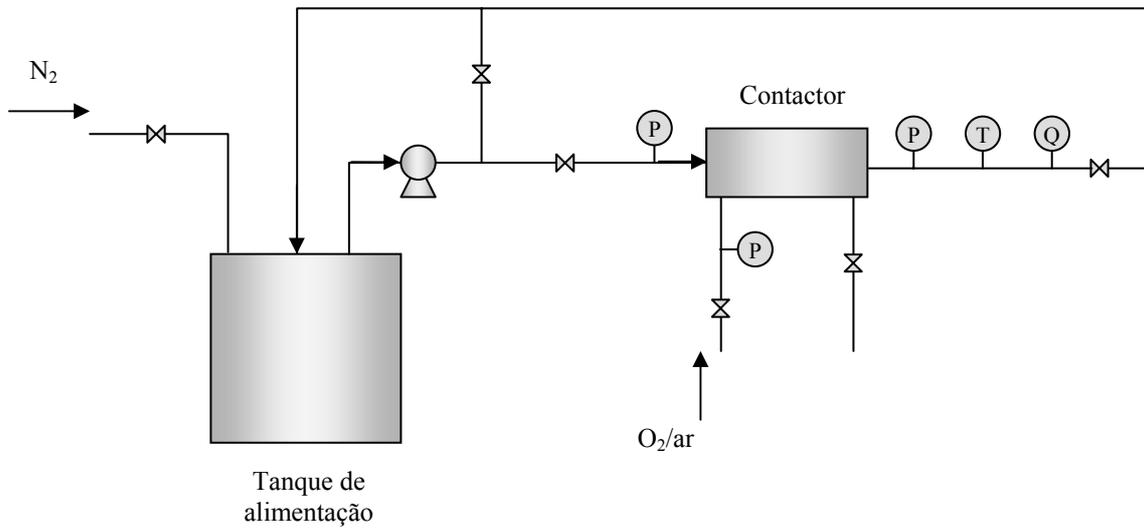
3.2.2.1. Testes de Permeação de Gas

Os módulos para os contactores gás/líquido foram caracterizados por permeação de gás, utilizando nitrogênio e oxigênio puros. Os testes de permeação foram realizados em sua maior parte a temperatura ambiente (25°C) e 1,0 bar de diferença de pressão através da membrana. O coeficiente de permeabilidade foi determinado através de medidas da quantidade de gás permeado por unidade de área e tempo. A razão entre as permeabilidades do O₂ e N₂ indica a presença de defeitos na camada densa das membranas compostas, valores menores que 1 mostram predominância do mecanismo de difusão de Knudsen, enquanto valores maiores que 1 mostram predominância do mecanismo de sorção-difusão, ou seja, ausência de defeitos. Os testes de permeabilidade foram conduzidos com a corrente gasosa de alimentação escoando pela parte interna das fibras microporosas simples, compostas com silicone e densas.

3.2.2.2. Testes de Oxigenação

Na Figura 3.8 estão apresentados um esquema e a fotografia do sistema utilizado para a realização dos experimentos. Inicialmente, para levar a concentração de oxigênio dissolvido a um valor próximo a zero borbulha-se nitrogênio ou adiciona-se bissulfito de sódio no tanque contendo o líquido. Em seguida, circula-se o líquido através do contactor com vazão e pressão pré-estabelecidas e é ajustada a pressão parcial de oxigênio desejada na corrente gasosa. A corrente líquida circula pela parte interna das fibras-ocas microporosas hidrofóbicas, entrando em contato com a gasosa através dos poros. Assim, há a transferência do oxigênio da corrente gasosa para a água. A variável resposta do sistema é a taxa de transferência de oxigênio, obtida através do acompanhamento do nível de oxigênio dissolvido no tanque contendo o líquido em estudo, a água, microfiltrada e deionizada.

a)



b)

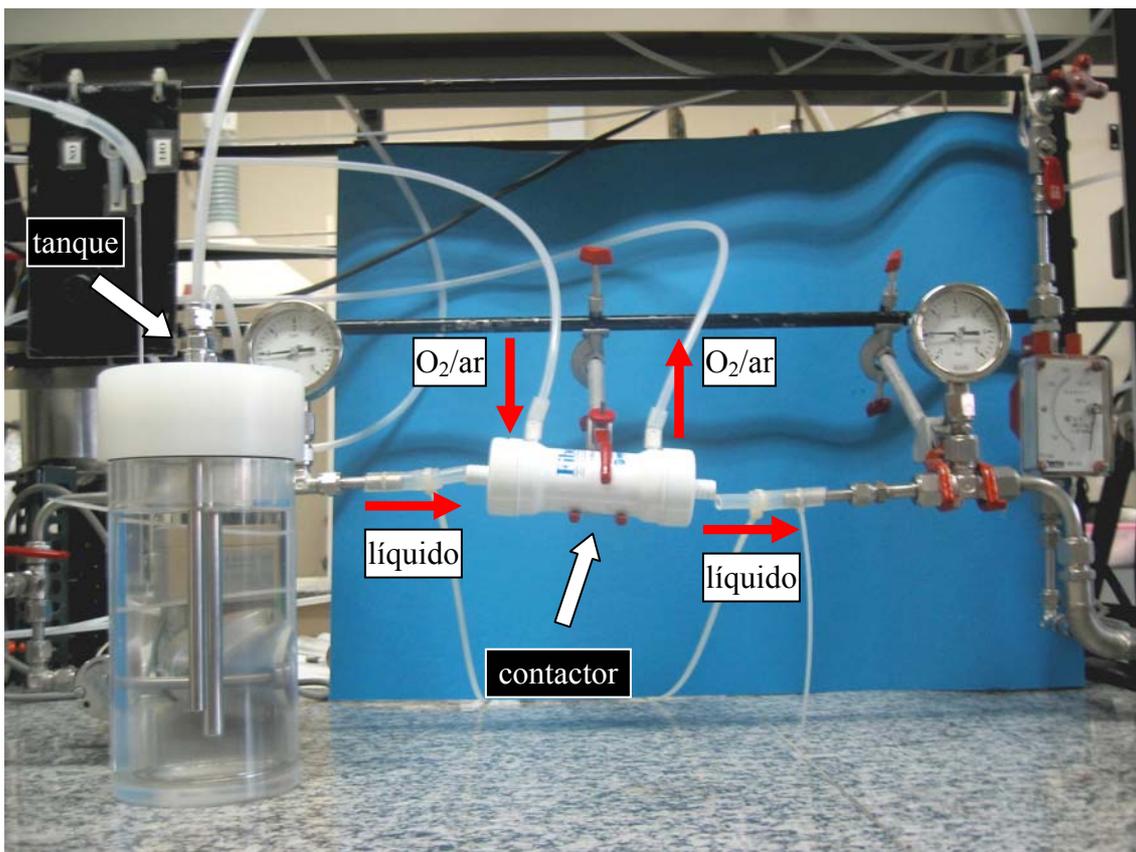


Figura 3.8: Aparato experimental: contactor/oxigenador de fibras-ocas. (a) fluxograma esquemático, (b) fotografia.

Os experimentos foram conduzidos com a utilização de ar comprimido ou oxigênio puro na corrente gasosa. Os dados de concentração de oxigênio foram obtidos e armazenados no registrador Ahlborn Almemo 2290-8, utilizando o sensor de oxigênio dissolvido Almemo FY A640-O2 disposto no tanque de alimentação. O perfil obtido de concentração de oxigênio com o tempo, para cada um dos experimentos, pode ser exemplificado pelo gráfico construído na Figura 3.9.

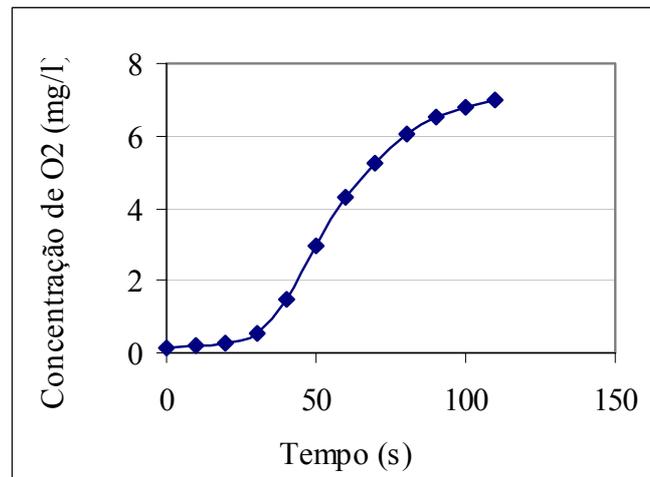


Figura 3.9: Variação da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo de operação em um teste de oxigenação através de membranas

Conforme será visto posteriormente, o perfil de concentração de O₂ obtido com o contactor de membrana é idêntico ao obtido na oxigenação convencional por borbulhamento. A concentração de oxigênio aumenta lentamente no início do experimento, atingindo, depois, uma região de crescimento linear até um determinado patamar estável. Os dados utilizados no tratamento matemático são aqueles da fase linear de crescimento da concentração e o valor do coeficiente volumétrico de transferência de massa ($K_L a$) é obtido através da Equação 3.2:

$$-\ln(c_{eq} - c) = K_L a * t \quad \text{Equação 3.2}$$

Onde c é a concentração de oxigênio dissolvido no tanque de alimentação e c_{eq} , a concentração de oxigênio dissolvido em equilíbrio com a fase gasosa. Já o valor do coeficiente de transferência de massa (K) pode ser obtido através da Equação 3.3.

$$K = K_L a^* \frac{V}{A}$$

Equação 3.3

Com V sendo o volume de água utilizado no experimento e A , a área total de membrana.

As principais variáveis de operação a serem avaliadas quanto à capacidade de oxigenação de determinado contactor foram a pressão parcial de oxigênio na corrente gasosa, a pressão da corrente líquida e a vazão desta corrente.

Os testes iniciais foram realizados com água destilada e microfiltrada. Na seqüência, testes com soluções contendo ramnolipídeos foram conduzidos, para a avaliação da influência da tensão superficial da corrente líquida sobre a capacidade de oxigenação das membranas em estudo.

A concentração de oxigênio dissolvido em equilíbrio com a fase gasosa foi calculada através das correlações estabelecidas por BLANCH e CLARK (1997). Para a temperatura de condução dos testes de oxigenação com água pura (25°C), a concentração de oxigênio dissolvido em equilíbrio com o ar a pressão atmosférica foi considerada igual a 8,1 mg/L. Levando-se em consideração a composição do meio de fermentação a ser utilizado e a temperatura que foi utilizada durante as fermentações, essa concentração é reduzida para 7,0 mg/L.

4. Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos na investigação da produção de biossurfactantes. O estudo consistiu de diferentes etapas, visando o estudo de um novo processo para condução da fermentação, com a inclusão da oxigenação não dispersiva utilizando um contactor com membranas. Inicialmente, foi realizada a simulação do processo de oxigenação, visando o maior entendimento do processo e a definição inicial das condições para os testes de oxigenação. Estes testes promoveram uma maior familiarização com o aparato experimental e apresentaram resultados importantes para a definição das condições para a condução dos testes fermentativos. As fermentações iniciais tiveram como objetivo o levantamento dos principais problemas e limitações, bem como observar o efeito das principais variáveis envolvidas no processo produtivo. As demais fermentações visaram o melhoramento do processo e à determinação das principais características e necessidades nutricionais da cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PA1, isolada de poços de petróleo.

4.1. Simulação do Oxigenador

O sistema de oxigenação por membranas foi avaliado através da simulação do processo de transferência de massa para identificar as principais resistências e a sensibilidades dos parâmetros envolvidos. Na maior parte dos casos, a estratégia adotada foi avaliar o valor da área total de membrana necessária para atingir determinada condição de oxigenação, ou seja, um valor especificado para o K_La . As influências dos coeficientes de transferência de massa na fase líquida e na camada densa, assim como da perda de carga da fase líquida escoando pelo interior das fibras também foram avaliadas.

Para o caso de fibras microporosas, foi avaliada também a influência da porosidade superficial sobre o valor da área total necessária para atender determinada condição de aeração. Considerando o escoamento de líquido interno às fibras e para as

condições definidas anteriormente, o comportamento obtido é apresentado na Figura 4.1.

Nessas condições, observa-se que, a partir de um valor de aproximadamente 10 % para a porosidade, o valor da área requerida de membrana é pouco influenciado pelo aumento dessa variável. Como as membranas normalmente utilizadas para este fim apresentam porosidade próxima a 20 %, pode-se dizer que pequenas variações desse parâmetro não afetarão muito o valor da área total de membrana requerida. Para o uso de membranas com porosidade acima de 20 %, os valores requeridos de área são inferiores a 2,0 m².

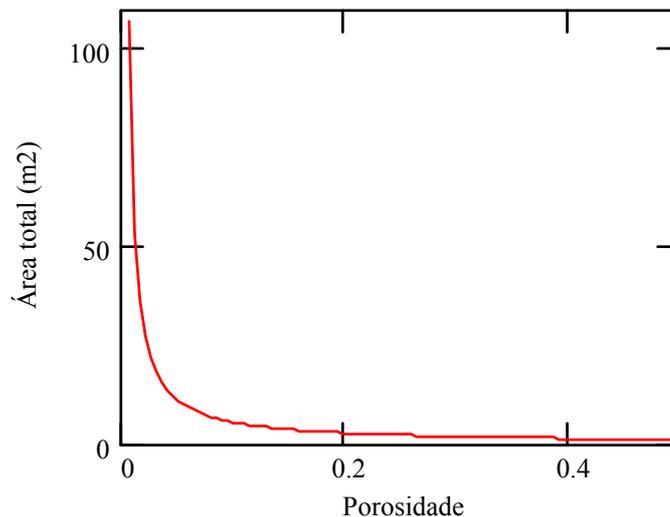


Figura 4.1: Variação do valor da área total de membrana com a porosidade superficial das fibras para atingir um coeficiente volumétrico de transferência de massa igual a 10 h^{-1} – escoamento interno da fase líquida.

Para as membranas compostas, foi avaliado o comportamento da área total requerida de membrana, com a espessura da pele densa, conforme apresentado na Figura 4.2.

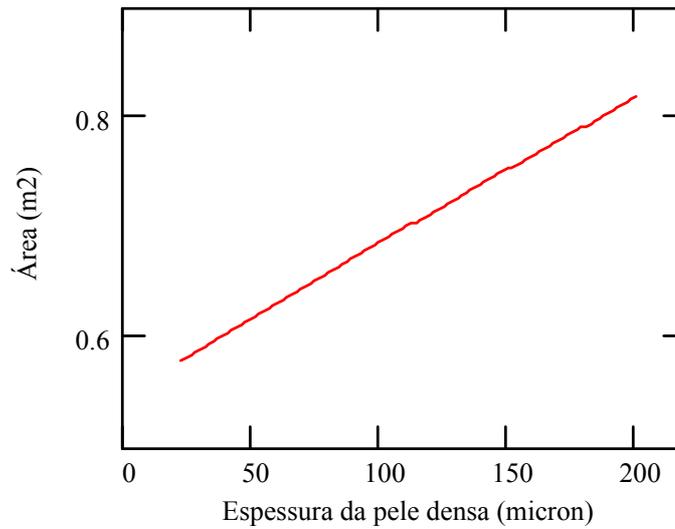


Figura 4.2: Variação do valor da área total de membrana com a espessura da camada superficial densa (para $K_L a = 10 \text{ h}^{-1}$) – escoamento interno da fase líquida.

Observa-se que a variação na área requerida de membrana é pouco afetada pela espessura da pele densa. Nas condições em estudo, observa-se que, para espessura de $200 \mu\text{m}$, o valor da área ainda é inferior a $1,0 \text{ m}^2$. Isso indica a possibilidade do uso de membranas densas de silicone, que apresentam espessura total com valores próximos a este, nesse tipo de oxigenador, em substituição às membranas compostas, sem que haja aumento significativo no valor da área total de membrana necessária.

Também para as membranas compostas, foram comparados os valores dos coeficientes de transferência de massa na fase líquida (K_L) e na camada de silicone (K_p). Ainda foram avaliados o comportamento de K_L com a variação da vazão total de líquido (Figura 4.3) e de K_p com a espessura da camada densa (Figura 4.4).

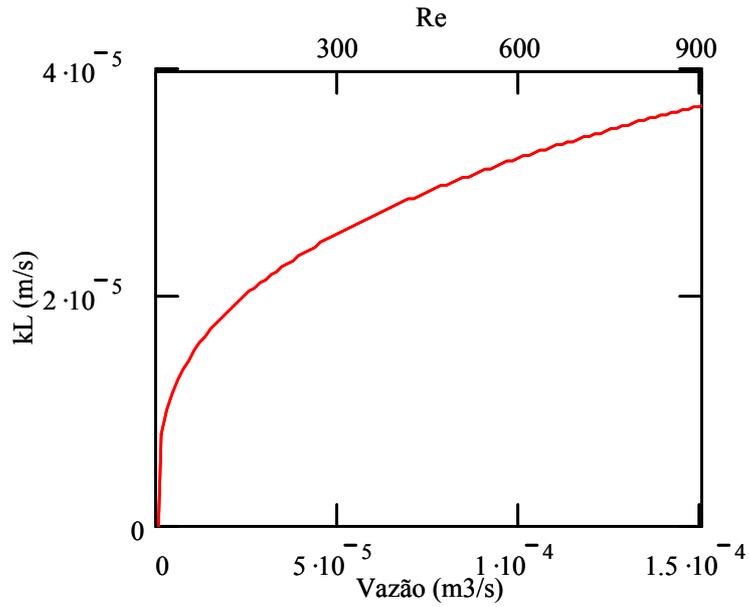


Figura 4.3: Variação do coeficiente de transferência de massa na fase líquida (k_L , em m/s) com a vazão total de líquido (em m^3/s) e o número de Reynolds (Re) – escoamento interno da fase líquida.

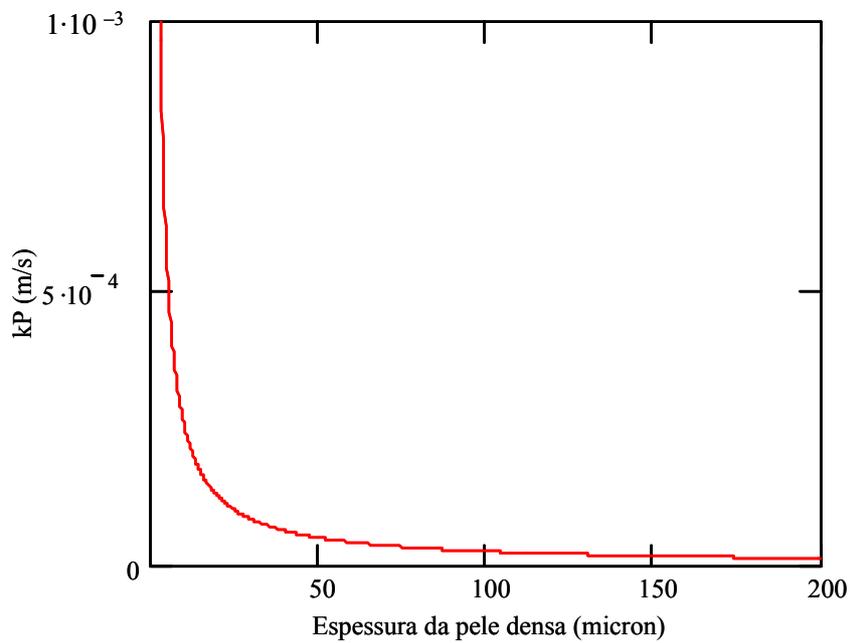


Figura 4.4: Variação do coeficiente de transferência de massa na camada densa (k_P , em m/s) com a sua espessura (expressa em micrômetro) – escoamento interno da fase líquida.

Como esperado, o aumento da vazão de líquido leva à diminuição na resistência à transferência de massa – aumento no valor de K_L . Esse aumento ocorre devido à diminuição das camadas limite hidrodinâmica e mássica pelo aumento da velocidade de escoamento do líquido no interior das fibras. O aumento no valor *de* K_L ocorre de forma mais acentuada no início da curva, para baixos valores de vazão, sendo mais suave para maiores valores.

Como esperado pelo modelo de sorção-difusão, o valor do coeficiente de transferência na camada densa diminui com o aumento de sua espessura. Para membranas com pele densa de espessura inferior a 50 μm (valor elevado para membranas compostas), observa-se que o valor de K_P é superior ao K_L , ou seja, a resistência ao transporte na camada densa é menor do que a resistência na fase líquida. Para membranas com camada densa de espessura reduzida ($< 10 \mu\text{m}$), essa diferença é de pelo menos uma ordem de grandeza, indicando que a etapa limitante do processo de transferência de massa se localiza na fase líquida.

Como observado na Figura 4.3, a vazão total do líquido tem forte influência sobre a eficiência da transferência de massa. Na Figura 4.5 está apresentado o gráfico com a variação do valor da área total de membrana em função da condição hidrodinâmica, representada pelo número de Reynolds, para diversos valores do coeficiente volumétrico de transferência de massa (K_{La}), para o contactor com fibras microporosas e o escoamento de líquido externo às fibras.

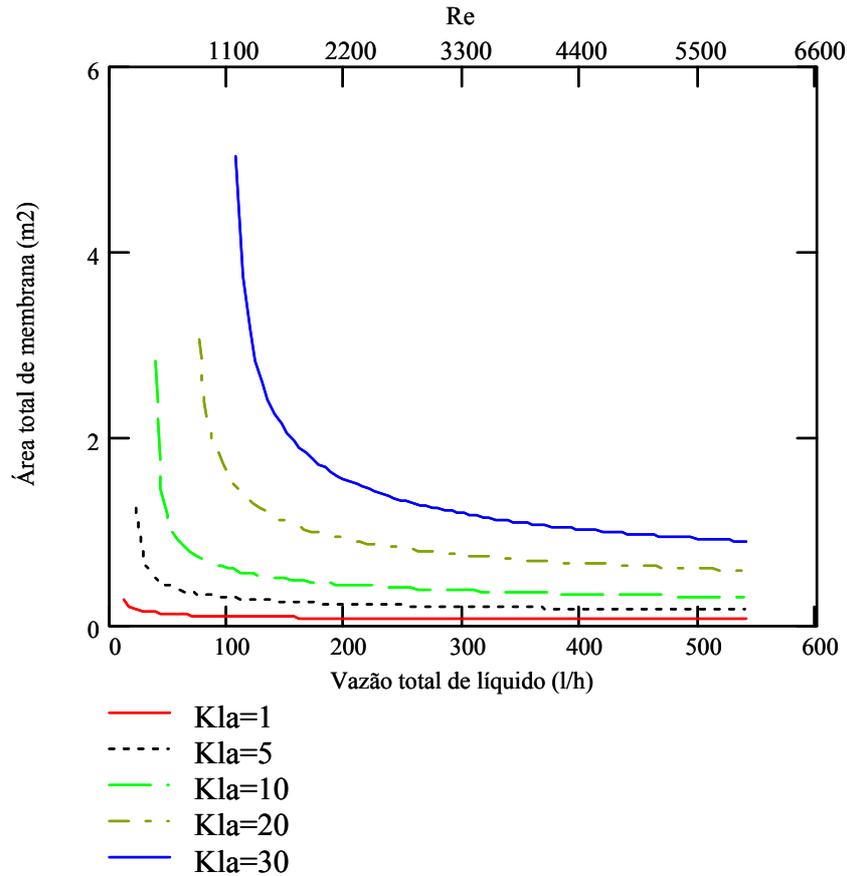


Figura 4.5: Avaliação da dependência da área total de membrana (m^2) com a vazão de líquido (L/h), o número de Reynolds (Re) e com o valor de K_{La} (em h^{-1}).

Como esperado, observa-se o aumento da área de membrana para maiores valores de oxigenação do meio (maiores valores de K_{La}). A área de membrana é reduzida pelo aumento da vazão de líquido, que acelera a transferência de oxigênio, como reportado por TAI *et al.* (1994) e por GABELMAN e HWANG (1999). Este efeito é mais acentuado para baixos valores do número de Reynolds. Desta forma, pode-se escolher condições de operação em que sejam atingidos os níveis de oxigenação adequados, mas mantendo a área de membrana próxima ao seu valor assintótico inferior.

Outro ponto avaliado foi a dependência da área de membrana com a pressão parcial de oxigênio na corrente gasosa. Para diferentes níveis de oxigenação (K_{La}), as Figuras 4.6 e 4.7 apresentam os gráficos da variação da área requerida de membrana com a pressão parcial do gás, considerando o uso de fibras microporosas e de fibras

compostas, respectivamente. O escoamento de líquido se dá pela porção interna das fibras nos dois casos.

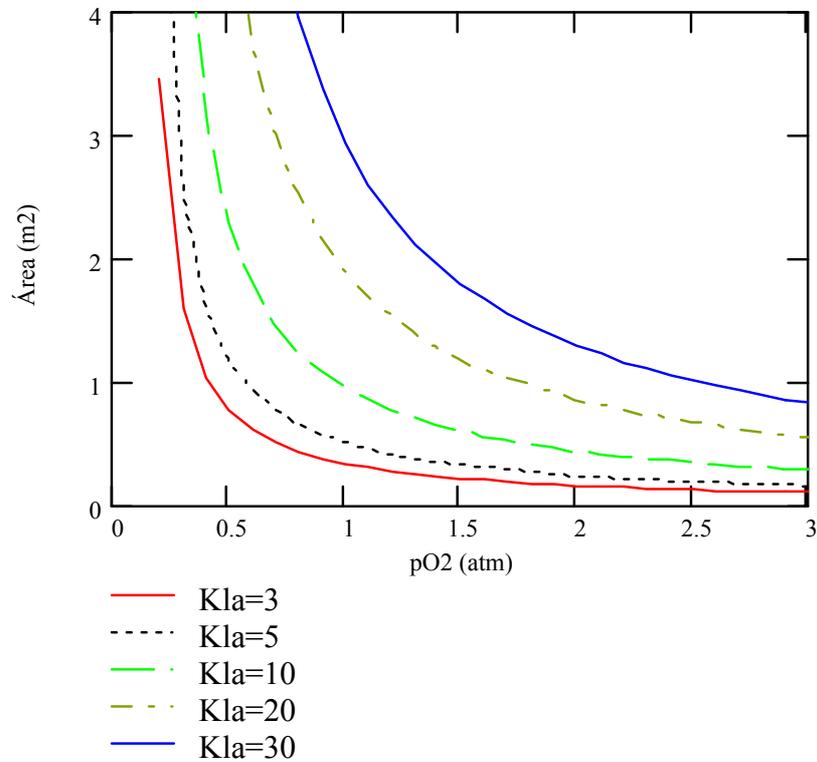


Figura 4.6: Avaliação da dependência da área total de membrana (m^2) com a pressão parcial de oxigênio (p_{O_2} , em atm) e com o valor de K_La (h^{-1})– membranas microporosas ($Re = 250$).

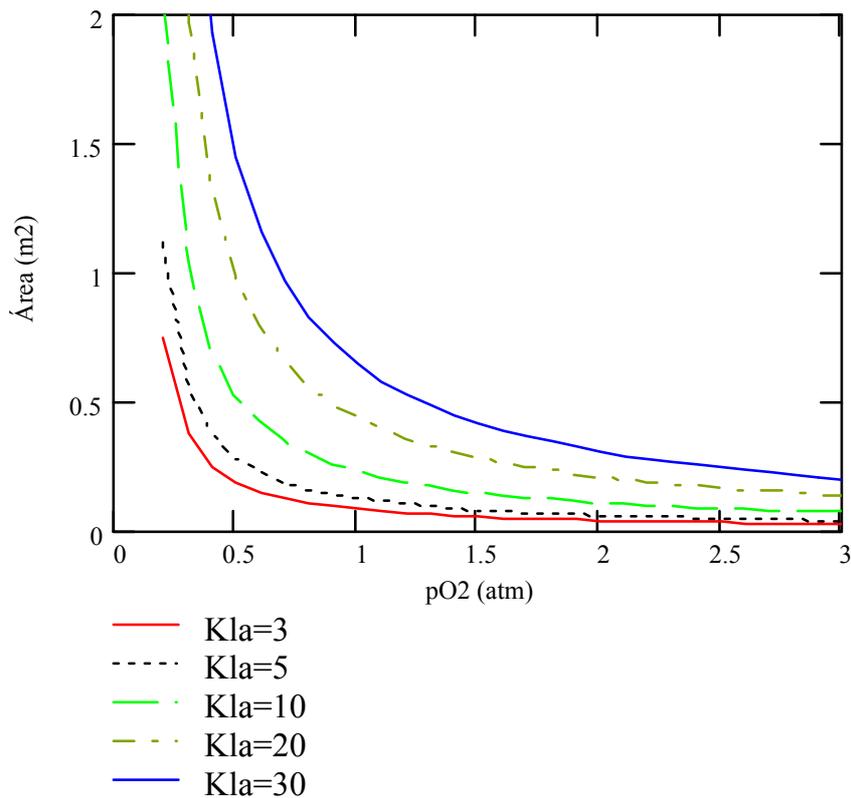


Figura 4.7: Avaliação da dependência da área total de membrana (m²) com a pressão parcial de oxigênio (pO₂, em atm) e com o valor de K_{La} (h⁻¹) – membranas microporosas cobertas com a camada superficial densa (Re = 250).

Em ambos os casos, observa-se redução no valor necessário para a área de membrana com o aumento da pressão parcial do oxigênio na fase gasosa. Como na avaliação do efeito da vazão de líquido, pode-se observar que determinadas condições de operação estão relacionadas a valores de área de membrana próximos às regiões assintóticas inferiores.

Outro importante ponto observado é a diminuição da área necessária, para as mesmas condições de operação, com o uso das fibras compostas. Isso pode ser explicado pelo fato de que a resistência ao transporte exercida pela pele, mesmo com espessuras relativamente elevadas, é comparável com a da fase líquida. Além disso, mesmo com a inserção dessa resistência extra, o uso da membrana composta leva ao aproveitamento de toda a área disponível para a troca, e não somente a área dos poros, como acontece nas membranas porosas. Deve ser considerado também que o material

escolhido para a formação dessa camada superficial, o silicone, é altamente compatível com o oxigênio, sendo a solubilidade deste gás na pele cerca de quatro vezes e meia maior do que na água. Essa diminuição no valor da área pode ainda ser observada através dos dados apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Valores de área de membrana obtidos para o uso de membranas microporosas e compostas, considerando a abordagem dos coeficientes de transferência de massa ($Re = 250$).

K_{La} (1/h)	p_{O_2} (atm)	Área (m^2)	
		Fibras porosas	Fibras compostas
3	0,4	0,38	0,10
10	0,4	2,67	0,62
10	1,0	0,45	0,11
40	1,0	4,45	1,01

Com a comparação dos valores obtidos para as fibras simples (porosas) com os valores para as fibras compostas, observa-se que estes são pelo menos quatro vezes superiores, indicando vantagens na escolha de membranas compostas para a oxigenação.

A Tabela 4.2 apresenta a comparação dos valores obtidos para a demanda de área de membrana obtidos, para o mesmo tipo de fibras, utilizando as duas diferentes abordagens para a simulação.

Tabela 4.2: Valores de área de membrana obtidos para o uso de membranas compostas, considerando as abordagens de coeficientes de transferência de massa e do balanço de massa para o gás na fibra ($Re = 250$).

K_{La} (1/h)	p_{O_2} (atm)	Área (m^2)	
		Coefficientes de transf. de massa	Balanço de massa
3	0,4	0,10	0,10
10	0,4	0,62	0,44
10	1,0	0,11	0,11
40	1,0	1,01	0,69

É observado que, em condições de oxigenação que necessitam de baixos valores de área de membrana, as duas abordagens de simulação levam a valores bem próximos. Quando a necessidade de área de membrana aumenta, observa-se que os valores obtidos utilizando a abordagem que emprega os coeficientes de transferência de massa estão superestimados. Entretanto, esta abordagem é eficiente e matematicamente simples para a obtenção de um valor preliminar para o projeto do contactor gás/líquido.

Também para as fibras compostas, avaliou-se o comportamento da área requerida de membrana com a variação da velocidade de escoamento, representada pela vazão de líquido por fibra. Para se manter o valor de oxigenação do meio (K_La), a vazão total de líquido foi mantida constante através da variação do número de fibras. Na Figura 4.8 está apresentado o gráfico com a variação da área com o número de Reynolds (e com a vazão por fibra) para dois valores distintos de K_La , com as demais condições do processo ainda definidas pelas Tabelas 3.2 e 3.3.

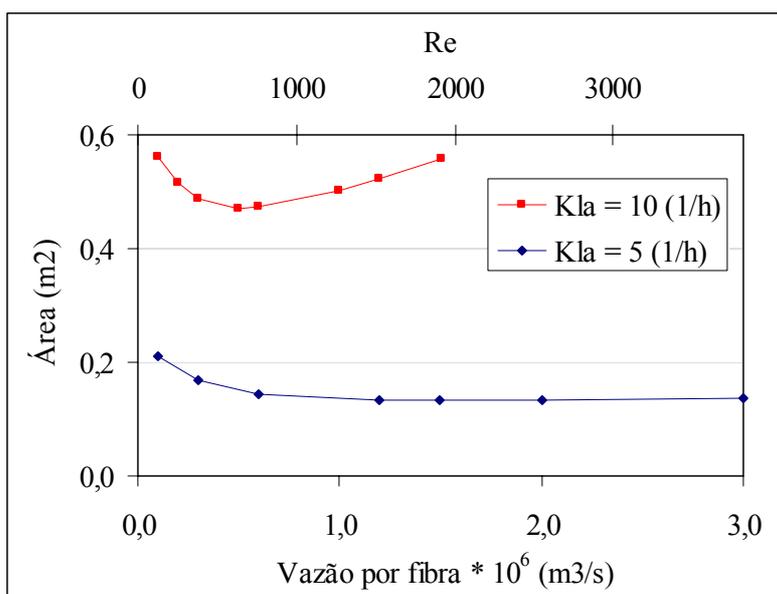


Figura 4.8: Variação do valor da área total de membrana (m²) com a vazão de líquido por fibra (m³/s) e com o número de Reynolds (Re).

Para baixos valores de Reynolds, observa-se que o seu aumento leva à diminuição da área de membrana necessária, o que pode ser explicado pelo favorecimento da transferência de massa devido à redução da camada limite hidrodinâmica e, conseqüentemente, o aumento no gradiente de concentração próximo a superfície da

membrana, a força motriz para o processo. Mas, com o contínuo aumento da velocidade de escoamento, o comportamento tende a ser invertido. Para maiores valores de velocidade, o seu aumento causa um aumento no valor da área. Este fato ocorre devido à necessidade de manter um determinado tempo de residência do líquido nas fibras para que seja possível atender determinada taxa de transferência requerida.

Quando realizado o balanço de massa para o oxigênio, para a determinação do fluxo de oxigênio e da área de troca, foi preciso a construção do perfil de concentração do gás ao longo da fibra. Esse perfil foi obtido da resolução da equação diferencial resultante do balanço de massa e é apresentado nas Figuras 4.9 e 4.10, para as condições de operação definidas anteriormente.

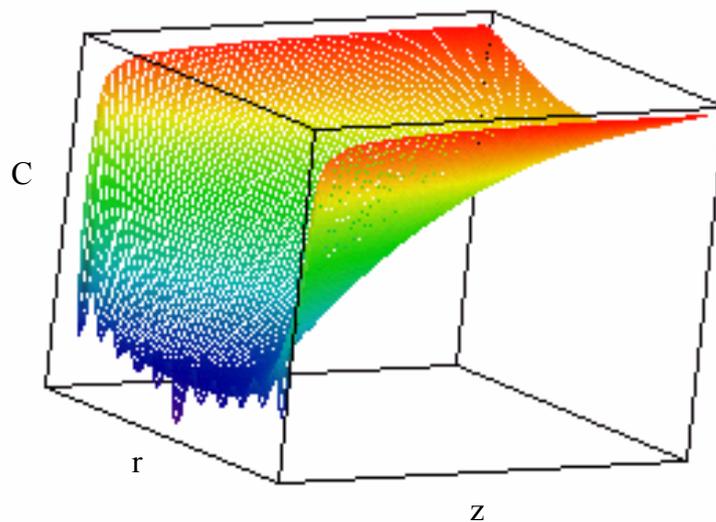


Figura 4.9: Perfil de concentração de oxigênio (C , variando de 0,0 a 16,2 mg/L) no interior de uma fibra composta. As coordenadas z (que varia de 0,0 a 10,0 m) e r (de 0,0 a 0,5 mm a partir do centro) representam as direções axial e radial, respectivamente. (condições de operação definidas na Tabela 3.3).

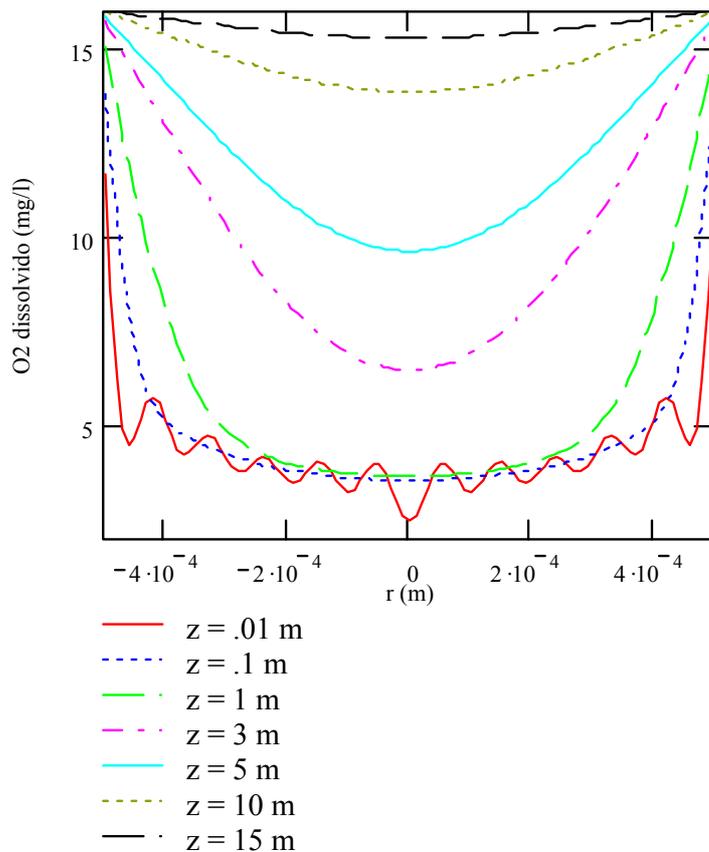


Figura 4.10: Perfis de concentração de oxigênio (C , em mg/L) no interior de uma fibra composta. As coordenadas z e r representam as direções axial e radial, respectivamente. (condições de operação definidas na Tabela 3.3).

Observa-se que, próximo da entrada da fibra (z pequeno), a concentração de oxigênio próximo às paredes das fibras é alta, com valores próximos ao da saturação em determinada pressão. No centro das mesmas essa concentração permanece próxima ao valor inicial de entrada. Quando se analisa o comportamento ao longo da direção axial, é observado que a concentração tende a um valor constante ao longo do raio e igual ao valor de saturação. A oscilação no perfil observada para baixos valores de z é decorrente de instabilidade matemática, resultante do somatório presente na equação que descreve esse perfil. Foi observado que quanto maior o número de raízes β_n , maior a precisão matemática obtida. Este fato pode ser acompanhado na Figura 4.11, onde são apresentados os perfis de concentração de oxigênio ao longo do raio r em $z = 0,01$ m com o uso de 3, 5 e 11 raízes β_n .

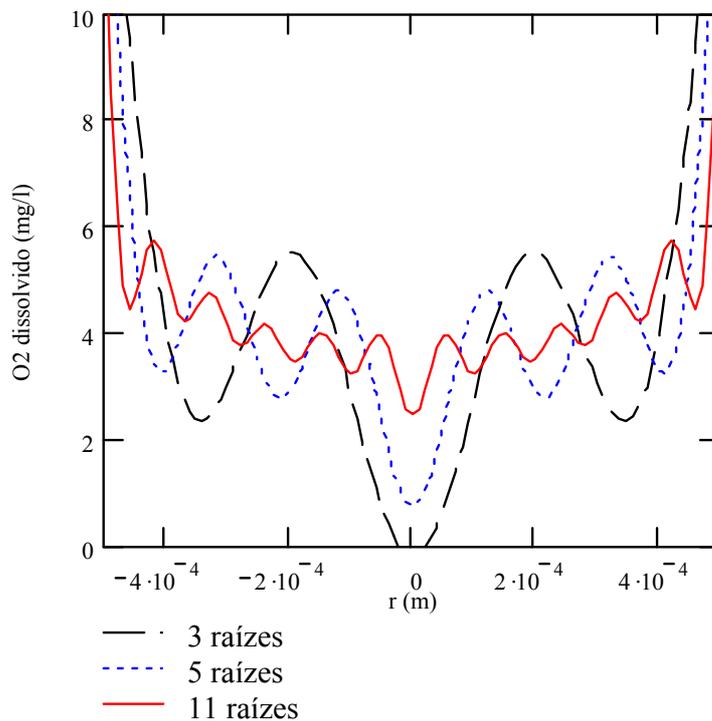


Figura 4.11: Influência do número de raízes utilizadas na função que descreve o perfil de concentração de oxigênio (em mg/L) em função da posição radial de uma fibra em $z = 0,01$ m; (condições de operação definidas na Tabela 3.3).

O comportamento da queda de pressão da corrente líquida ao longo da fibra também foi avaliado em função da vazão de líquido por fibra e para determinada condição de oxigenação. A Figura 4.12 apresenta o gráfico da dependência da queda de pressão com a vazão por fibra, considerando o escoamento de líquido internamente às fibras compostas.

Inicialmente, observa-se uma redução superior a 50% na perda de carga na direção axial da fibra com o aumento da vazão de líquido. Isto acontece devido as melhores condições para a transferência de massa e, conseqüentemente, a diminuição no valor da área requerida de membrana, ou seja, redução no comprimento das fibras. Com o aumento contínuo da vazão, a diminuição no valor do comprimento das fibras acontece de forma mais gradativa, sendo predominante o efeito provocado pelo aumento da velocidade de escoamento do líquido.

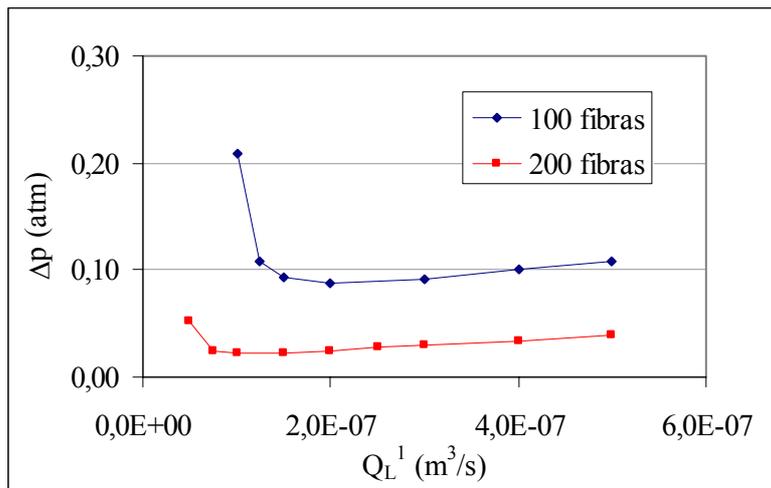


Figura 4.12: Queda de pressão (Δp , em atm) na direção axial da fibra em função da vazão de líquido por fibra (Q_L^1 , em m^3/s) – condições de operação definidas nas Tabelas 3.2 e 3.3.

4.2. Testes de Permeação de Gases

Três tipos de membranas foram caracterizados e testados na oxigenação de meios aquosos, todas na forma de fibras ocas. Preparou-se fibras ocas compostas, utilizou-se fibras compostas e fibras densas comerciais.

4.2.1. Fibras Compostas Desenvolvidas

A caracterização do módulo comercial com fibras microporosas, após os sucessivos recobrimentos com solução de PDMS em iso-octano, foi realizada inicialmente por permeação de gases – nitrogênio e oxigênio – para acompanhar a formação da camada superficial seletiva.

A Tabela 4.3 apresenta os resultados de permeabilidade gasosa e seletividade ao oxigênio obtidos nos testes.

Tabela 4.3: Caracterização do módulo comercial com membranas microporosas, após as etapas de recobrimento com solução de PDMS em iso-octano.

Etapa de Cobrimento	Permeabilidade (cm ³ /cm ² .s.cmHg)		Seletividade (O ₂ /N ₂)
	N ₂	O ₂	
início	9,26E-04	8,53E-04	0,92
4	9,66E-04	8,76E-04	0,91
5	9,66E-04	8,76E-04	0,91
6	8,76E-04	7,89E-04	0,90
7	7,89E-04	7,45E-04	0,94
8	3,16E-06	6,39E-06	2,03

A seletividade ao oxigênio (2,03) indica a formação da camada superficial densa e a predominância do mecanismo de sorção-difusão após 8 etapas de cobertura. A análise dos resultados indica que o procedimento utilizado para a formação de membranas compostas foi efetivo na obtenção da pele densa. Porém, foram observados alguns defeitos que apareceram após uma etapa de recobrimento adicional, durante a confecção do contactor, realizada para conferir maior resistência ao filme denso. Estes defeitos foram reparados com novos recobrimentos, entretanto, foi observado o total bloqueio dos orifícios internos de algumas fibras, inviabilizando a sua utilização como oxigenador. Desta forma, estas fibras não foram mais utilizadas nos testes de oxigenação.

4.2.2. Fibras Compostas Comerciais

As fibras compostas comerciais também foram caracterizadas individualmente quanto à permeação de oxigênio e nitrogênio. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Caracterização individual das fibras compostas comerciais por permeação de gases. Valores representam médias de 3 medidas.

Fibras compostas	Permeabilidade (cm ³ /cm ² .s.cmHg)		Seletividade (O ₂ /N ₂)
	N ₂	O ₂	
Silicone	5,22E-05	1,28E-04	2,44

A fibra composta comercial apresentou seletividade em torno de 2,5 para o oxigênio frente ao nitrogênio e altos valores de permeabilidade, indicando a presença de uma camada superficial com espessura muito reduzida.

Com os dados de permeabilidade obtidos nestes testes, os valores das áreas efetivas dos módulos construídos a partir destas fibras puderam ser determinados com o uso dos valores de fluxo dos gases nos mesmos.

4.2.3. Fibras Densas Comerciais

Os dados de fluxo permeado, em função da diferença de pressão através da membrana, obtidos nos testes de caracterização das fibras comerciais densas de silicone estão apresentados na Figura 4.13.

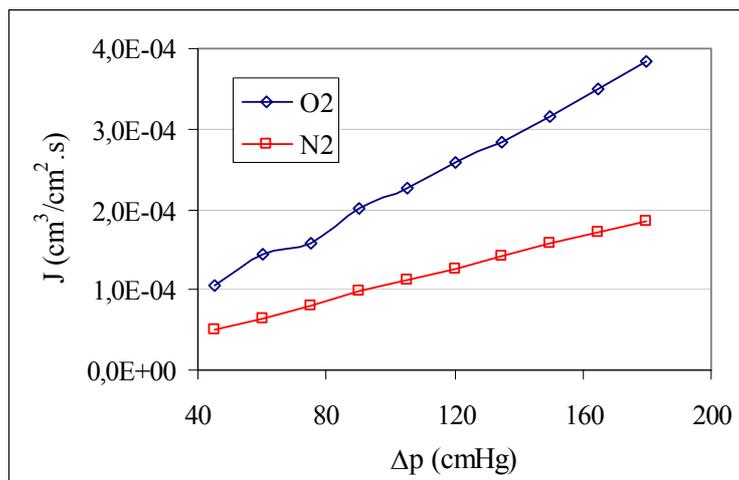


Figura 4.13: Fluxo permeado (J, em cm³/cm².s) em função da diferença de pressão através da membrana (Δp , em cmHg) para as membranas densas de silicone.

Como esperado, o material se mostrou seletivo ao oxigênio frente ao nitrogênio, porém com baixos valores de permeabilidade, como pode ser observado na Tabela 4.5. Isto se deve à espessura da camada densa, 0,20 mm, que confere grande resistência ao transporte dos gases, quando comparado com as membranas compostas.

Tabela 4.5: Caracterização das fibras densas comerciais por permeação de gases – O₂ e

N₂.

Permeabilidade (cm ³ /cm ² .s.cmHg)		Seletividade (O ₂ /N ₂)
N ₂	O ₂	
1,01E-06	2,03E-06	2,01

4.3. Testes de Oxigenação

Os testes de oxigenação foram conduzidos inicialmente com água e, posteriormente, com um meio fermentado bruto (sem a remoção das células) esterilizado. Este meio era proveniente de uma produção de biossurfactante do tipo ramnolípido por uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PA1. Estes testes foram realizados para a avaliação das fibras microporosas simples, das fibras compostas e das fibras densas. Os testes com as fibras compostas desenvolvidas no laboratório indicaram a presença de defeitos na camada densa superficial.

4.3.1. Fibras Microporosas

Inicialmente, foram realizados testes de oxigenação de água com o módulo comercial FiberFlo[®], constituído de fibras microporosas. Para tanto, os experimentos foram conduzidos com a utilização de oxigênio puro na corrente gasosa que escoava externamente às fibras e o volume de água utilizado foi igual a 1,0 litro. O objetivo primário era estudar a influência de alguns parâmetros sobre a taxa de oxigenação, a saber, a pressão parcial de oxigênio na corrente gasosa (pO_2), a diferença de pressão absoluta entre as fases líquida e gasosa (Δp) e a vazão da corrente líquida (Ql). A faixa de variação desses parâmetros é apresentada na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Faixa de variação dos parâmetros em estudo.

Parâmetro	Unidade	Valor mínimo	Valor máximo
pO_2	Bar	1,0	2,0
Δp	Bar	0,0	0,6
Ql	L/h	20	60

Na Tabela 4.7 está apresentado o planejamento experimental utilizado neste estudo. O objetivo deste planejamento foi a avaliação da sensibilidade e o melhor conhecimento do sistema de oxigenação não dispersiva por membranas. Os experimentos foram realizados em ordem aleatória para evitar erros sistemáticos. As principais finalidades matemáticas dos experimentos planejados estão descritas abaixo:

- plano fatorial a dois níveis (identificação dos efeitos) - experimento 1 a 8;
- plano em cruz (identificação das não linearidades) - experimento 12 a 17;
- réplicas no ponto central (determinação do erro experimental) - experimento 9 a 11;

Tabela 4.7: Planejamento experimental.

Experimento	Variável		
	Ql (L/h)	Δp (bar)	pO_2 (bar)
01	20 (-1)	0,0 (-1)	1,0 (-1)
02	20 (-1)	0,0 (-1)	2,0 (+1)
03	20 (-1)	0,6 (+1)	1,0 (-1)
04	20 (-1)	0,6 (+1)	2,0 (+1)
05	60 (+1)	0,0 (-1)	1,0 (-1)
06	60 (+1)	0,0 (-1)	2,0 (+1)
07	60 (+1)	0,6 (+1)	1,0 (-1)
08	60 (+1)	0,6 (+1)	2,0 (+1)
09	40 (0)	0,3 (0)	1,5 (0)
10	40 (0)	0,3 (0)	1,5 (0)
11	40 (0)	0,3 (0)	1,5 (0)
12	20 (-1)	0,3 (0)	1,5 (0)
13	60 (+1)	0,3 (0)	1,5 (0)
14	40 (0)	0,0 (-1)	1,5 (0)
15	40 (0)	0,6 (+1)	1,5 (0)
16	40 (0)	0,3 (0)	1,0 (-1)
17	40 (0)	0,3 (0)	2,0 (+1)

Os valores de K_{La} e K_L obtidos para todos os experimentos do plano experimental estão apresentados na Tabela 4.8. Foi obtida uma grande faixa de valores para o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio para água pura, mesmo com o pequeno intervalo de variação das variáveis independentes, indicando a possibilidade do uso de um mesmo contactor para atender a diversas necessidades de oxigenação. Os valores obtidos para os coeficientes de transferência de massa (K_L) estão na ordem de

grandeza dos coeficientes normalmente reportados para o transporte em fase líquida (MULDER, 1991).

Tabela 4.8: Valores dos coeficientes de transferência obtidos através do tratamento matemático dos dados experimentais.

Ordem no Planejamento Experimental	Ql (L/h)	Δp (bar)	pO_2 (bar)	K_{La} (h^{-1})	$K_L \cdot 10^5$ (m/s)
1	20,0	0,0	1,0	27,0	1,25
2	20,0	0,0	2,0	21,6	1,00
3	20,0	0,6	1,0	14,8	0,68
4	20,0	0,6	2,0	16,2	0,75
5	60,0	0,0	1,0	37,8	1,75
6	60,0	0,0	2,0	29,9	1,38
7	60,0	0,6	1,0	50,8	2,35
8	60,0	0,6	2,0	32,0	1,48
9	40,0	0,3	1,5	28,4	1,32
10	40,0	0,3	1,5	33,1	1,53
11	40,0	0,3	1,5	25,6	1,18
12	20,0	0,3	1,5	14,4	0,67
13	60,0	0,3	1,5	32,8	1,52
14	40,0	0,0	1,5	22,0	1,02
15	40,0	0,6	1,5	31,0	1,43
16	40,0	0,3	1,0	15,8	0,73
17	40,0	0,3	2,0	26,6	1,23

No tratamento estatístico dos dados, as variáveis independentes foram normalizadas para valores entre -1 e 1, e x_1 , x_2 e x_3 correspondiam a Ql , Δp e pO_2 , respectivamente. A variável resposta (y) foi o valor de K_{La} .

Das réplicas realizadas no ponto central (experimentos 9, 10 e 11), determinou-se o erro experimental (variância e desvio padrão). Esse erro foi considerado constante em toda a região experimental. O desvio padrão obtido para a variável resposta foi de 3,82 e a variância, 14,56.

Com um modelo escolhido, foi realizada a estimação dos parâmetros deste modelo com o auxílio do programa *Statistica* (Statistica 6.0, StatSoft, Inc. – Nonlinear Estimation). O modelo selecionado está apresentado na Equação 4.1.

$$y = a_0 + a_1*x_1 + a_2*x_2 + a_3*x_3 + b_{12}*x_1*x_2 + b_{13}*x_1*x_3 + b_{23}*x_2*x_3 + c_1*x_1^2 + c_2*x_2^2 + c_3*x_3^2$$

Equação 4.1

Este modelo pode contemplar a análise dos efeitos quadráticos sobre as variáveis devido à integração do plano em cruz com o plano fatorial a dois níveis. Antes de se realizar qualquer interpretação dos resultados obtidos, foi realizada uma análise da significância dos parâmetros. Inicialmente, definido um nível de confiança de 95%, um parâmetro foi considerado não significativo se seu desvio padrão multiplicado pelo fator 1,96 fosse maior que seu valor estimado, ou seja, para um parâmetro a ser considerado significativo, $a > 1,96*\sigma_a$ ($p < 0,05$, p – significância estatística). Assim, sem os parâmetros considerados não significativos, os parâmetros do novo modelo eram estimados e essa análise de significância, refeita, até que todos os parâmetros obtidos para determinado modelo fossem considerados significativos. O modelo inicial com 10 parâmetros foi então reduzido a um modelo com 2 parâmetros, conforme apresentado na Equação 4.2. Os valores obtidos para estes parâmetros estão na Tabela 4.9.

$$y = a_0 + a_1*x_1 + b_{12}*x_1*x_2$$

Equação 4.2

Tabela 4.9: Parâmetros obtidos para o modelo reduzido

	a_0	a_1	b_{12}
Estimativa	27,04	8,93	4,09
Desvio Padrão	1,42	1,85	2,07

O coeficiente de correlação obtido foi baixo ($R^2 = 0,661$), mas este resultado leva a interpretação de que a principal variável independente que apresenta influência sobre o valor do coeficiente volumétrico de transferência de massa é a vazão total de líquido (x_1). Ainda há um parâmetro significativo (b_{12}) que representa a interação entre duas variáveis, a vazão da corrente líquida e a diferença de pressão entre as fases. Como esperado, o valor da pressão parcial de oxigênio na corrente gasosa não influencia o coeficiente de transferência. Essa variável só apresenta influência sobre a quantidade de gás transferida para a corrente líquida, indicando que ela modifica apenas a força motriz do processo, que é a diferença de concentração de oxigênio entre as fases.

A má qualidade do ajuste se deu pela grande variação experimental. Essa variação experimental pode ser explicada pela formação de bolhas de gás na corrente aquosa. A corrente líquida pressurizada, saturada com oxigênio, após a passagem pelo contactor, era subitamente despressurizada à pressão atmosférica com sua passagem pela válvula de controle de pressão. Essa redução de pressão diminuía a concentração de saturação do gás, levando à formação de bolhas. O gás perdido na forma de bolhas não era detectado pelo sensor, levando a uma avaliação errônea da quantidade de gás transferida. Entretanto, a conclusão mais importante destes testes iniciais foi a confirmação da viabilidade deste processo para a oxigenação.

Como o objetivo era oxigenar uma corrente contendo biossurfactantes, uma amostra de um meio fermentado proveniente da produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em frascos agitados foi avaliada quanto a sua tensão superficial, em um tensiômetro (Sigma 70 – KSV Instruments Ltd.). Essa análise se fez necessária para a determinação da possibilidade da imobilização da interface gás/líquido na entrada dos poros das membranas, essencial para este processo. Soluções com tensões superficiais inferiores à água poderiam implicar em menores pressões de intrusão, resultando na passagem de líquido para a fase gasosa. O valor de tensão superficial obtido para a água utilizada nos testes iniciais foi de 69,8 mN/m. Já a solução diluída contendo os biossurfactantes do tipo ramnolipídeo, mesmo que em baixa concentração, apresentou tensão superficial de apenas 28,4 mN/m. Isso representou uma redução de 59% no valor da tensão superficial e indicou um possível problema na condução do processo de oxigenação deste tipo de solução com a utilização de membranas microporosas. O valor de tensão superficial obtido no presente trabalho está de acordo com os melhores resultados reportados até o presente momento na literatura científica. O menor valor de tensão superficial obtido por HABA *et al.* (2000), para um meio de produção de ramnolipídeos por bactérias do gênero *Pseudomonas* a partir de óleo de oliva foi de 32 mN/m. Já RAZA *et al.* (2007) obtiveram como menor valor de tensão superficial no meio fermentativo, com o uso de bactérias da espécie *Pseudomonas putida* mutantes, 31,2 mN/m, após o estudo com diferentes fontes de carbono. WU *et al.* (2007) obtiveram valores de tensão superficial de até 26,4 mN/m com a produção de ramnolipídeos a partir de glicerol por *Pseudomonas aeruginosa*.

Nos testes de oxigenação desta solução com fibras ocas microporosas, como esperado, observou-se a passagem de líquido para a fase gasosa com a aplicação de um mínimo valor para a diferença de pressão entre as fases. Desta forma, a estratégia experimental foi concentrada na avaliação da capacidade de oxigenação utilizando contactores com fibras compostas ou densas. Esses tipos de membranas não apresentam poros e eliminam o problema de intrusão e passagem do líquido (HINES e MADDOX, 1985).

4.3.2. Fibras Compostas

Inicialmente, todos os testes de oxigenação foram conduzidos com a utilização das fibras compostas com silicone. Os primeiros testes foram realizados com um módulo com apenas 16 fibras e 0,013 m² de área. Como o número de fibras era baixo e seu diâmetro interno era muito pequeno, a perda de carga obtida no escoamento de líquido interno às fibras foi muito grande. Optou-se então pelo escoamento da corrente líquida pela carcaça do módulo. Como a camada superficial densa dessas fibras se encontra na superfície interna, nessa situação a fase líquida estava em contato com o suporte poroso das membranas. Foram realizados testes tanto com água quanto com o meio fermentado esterilizado contendo ramnolipídeos e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10: Testes de oxigenação com as fibras compostas comerciais. Escoamento de líquido externo às fibras. Volume de líquido = 1,0 L. Área = 0,013 m².

Líquido	Q _L (L/h)	p _L (bar)	p _G (bar)	K _L a (h ⁻¹)	K _L (m/s)
água	40	1,0	1,0	0,46	9,93E-05
meio	47,5	1,0	1,0	0,02	3,88E-06
água*	40	1,0	1,0	0,06	1,19E-05
água**	40	1,0	1,0	0,32	6,88E-05

(*) Após teste com o meio. (**) Após limpeza com ultra-som.

No caso dos testes iniciais com água, foram obtidos altos valores para o coeficiente de transferência de massa K_L . Estes valores foram até 10 vezes superiores aos obtidos com as fibras microporosas em condições semelhantes. Cabe ressaltar que os baixos valores obtidos para o coeficiente volumétrico de transferência de massa, K_La ,

estão relacionados com o reduzido valor de área utilizado. Os valores elevados de K_L podem ser relacionados ao escoamento externo do líquido. Quando o líquido a ser oxigenado escoar pela parte interna das fibras pode ficar saturado com o gás transferido, antes do final do módulo. Isso minimiza o potencial de transferência do sistema. Quando o escoamento se dá externamente às fibras, o volume do seio da fase líquida é maior, mantendo a diferença de concentração, que é a força motriz do processo.

Nos testes realizados para a oxigenação da solução contendo o biossurfactante, foi observada redução no coeficiente de transferência de massa em aproximadamente 95%. Quando o mesmo módulo, logo após o teste com a solução de biossurfactantes, foi testado na oxigenação de água, o valor inicial obtido para o K_L não foi atingido. Como a solução de teste foi constituída de um meio fermentado bruto, sem nenhum tipo de procedimento de purificação, havia, além dos biossurfactantes, outras substâncias como proteínas de alta massa molar e fragmentos celulares. Esse material, em especial as proteínas, possivelmente ficaram aderidas ao suporte poroso das membranas, prejudicando o transporte do gás. Os valores iniciais do coeficiente de transferência obtidos para a água somente foram parcialmente restabelecidos após o tratamento com ultra-som para a limpeza das membranas. Deste modo, a oxigenação das correntes provenientes das fermentações precisou então ser conduzida com o escoamento da fase líquida interno às fibras, com esta fase em contato com a camada superficial densa da membrana.

Os testes de oxigenação com o escoamento de líquido pela parte interna das fibras foram realizados com novos módulos, contendo maior número de fibras e, conseqüentemente, maior área. Os testes foram inicialmente realizados com dois módulos, com valores de área (medida internamente às fibras) iguais a 0,14 e 0,36 m². Foram conduzidos testes de oxigenação com o uso dos módulos separadamente ou em paralelo, com água e meio fermentado bruto contendo ramnolipídeos. Alguns resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11: Testes de oxigenação com as fibras compostas comerciais. Escoamento de líquido interno às fibras. Volume de líquido = 1,0 L. Módulo 01 - 0,14 m²; Módulo 02 - 0,36 m². Módulo 01 + Módulo 02 em paralelo - 0,50 m².

Módulo	Líquido	Q _L (L/h)	p _G (bar)	K _L a (h ⁻¹)	K _L (m/s)
01	água	40	0,5	5,71	1,13E-05
01	meio	45	0,5	4,91	9,74E-06
01	água*	40	0,6	1,83	3,63E-06
01	água**	40	0,6	2,20	4,37E-06
02	água	25	0,5	3,35	2,58E-06
01 + 02	água	40	0,6	5,49	3,05E-06
01 + 02	água	40	1,0	3,46	1,92E-06

(*) Após teste com o meio. (**) Após limpeza com ultra-som.

Observou-se que os valores obtidos para os coeficientes de transferência de massa foram equivalentes aos obtidos anteriormente, para o uso das fibras microporosas simples. Como discutido anteriormente, este resultado evidencia que, mesmo com a presença de uma resistência extra ao transporte relacionada com a camada superficial de silicone, não houve prejuízo ao transporte de gás nestas fibras. Nestes testes também foi observada a diminuição da transferência de oxigênio para o meio fermentado com relação à água. Mas, nesse caso, a condição inicial, antes do teste com o meio, não foi retomada após a limpeza das fibras com o uso de ultra-som. Como o escoamento da fase líquida se dá em contato com a camada densa, e não com os poros, não há a possibilidade da entrada de material celular ou de subprodutos da produção do biossurfactante nos mesmos. E a adesão desse material na parede interna das fibras seria refletida em uma maior resistência ao escoamento, resultando em maior queda de pressão entre a entrada e a saída do módulo, o que não foi observado.

A explicação para este fato pode estar na condensação de água no interior dos poros do suporte das fibras. Assim como o oxigênio é transferido da corrente gasosa para a corrente líquida, água também é transferida, só que em sentido oposto. A água se dissolve na camada superficial de silicone e se difunde em direção à corrente gasosa, devido ao gradiente de concentração. Ao atingir o final da camada superficial, a água passa para a fase gasosa, agora em estado de vapor, ainda dentro das fibras. Se as condições operacionais forem favoráveis, poderá ocorrer o fenômeno de condensação

capilar, dificultando a transferência dos gases. Essa condensação capilar pode ser predita pela equação de Kelvin (GALVIN, 2005), que relaciona a pressão de vapor de um composto dentro de um poro com a sua concentração. Quanto maior a concentração, menor a sua pressão de vapor nesse poro, o que indica a maior propensão à condensação. Assim, se a concentração de vapor d'água se elevar muito, poderá ser observada a condensação capilar. Para que não ocorra essa condensação, a vazão da corrente gasosa deve ser suficiente para manter o gradiente de concentração do vapor d'água entre a superfície externa das fibras e o início da camada densa de silicone, na parte interna das mesmas, garantindo assim o fluxo contínuo de água. Se a vazão de gás não for suficiente, ocorre a obstrução sucessiva dos poros do suporte, reduzindo gradativamente a capacidade de oxigenação das fibras. Essa redução foi observada em todos os experimentos realizados.

Também foram realizados testes de caracterização dos contactores antes e depois da realização de uma fermentação, conduzida com a oxigenação realizada exclusivamente através destes contactores. Em um teste de oxigenação, realizado no próprio fermentador com o uso de dois contactores com fibras compostas com silicone, totalizando 0,33 m² de área, foi observada uma clara redução na capacidade de oxigenação deste tipo de módulo após a condução de uma fermentação com duração de 12 dias e condições descritas anteriormente no item 3.1.4. Este resultado pode ser observado na Figura 4.14.

Após o uso dos contactores de membranas para a oxigenação da corrente líquida do fermentador, sua capacidade de oxigenação foi reduzida em 80%. O coeficiente de transferência de oxigênio (K_L) diminuiu de $8,2 \cdot 10^{-6}$ para $1,6 \cdot 10^{-6}$ m/s. Como discutido, este resultado foi atribuído a condensação capilar do vapor de água nos poros do suporte microporoso.

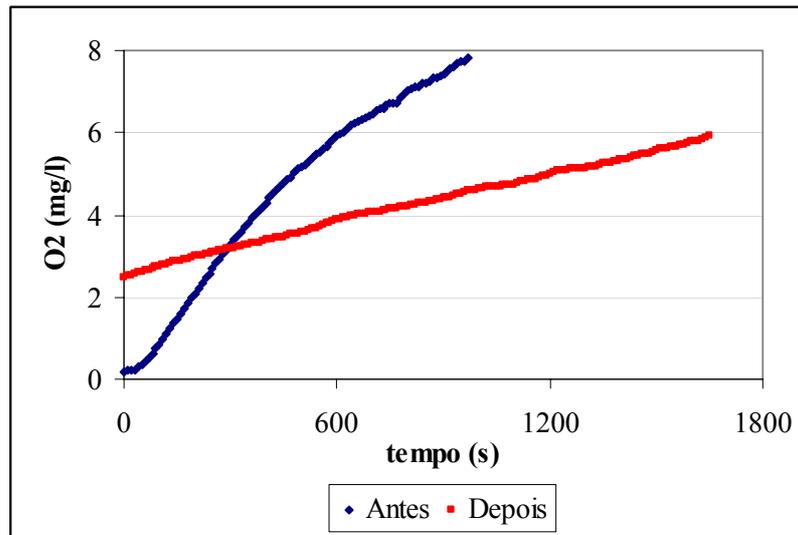


Figura 4.14: Variação da concentração de oxigênio dissolvido (mg/L) com o tempo (s).

Testes de oxigenação de água realizados antes e depois da condução de uma fermentação para a produção de ramnolipídeos. Frequência de agitação em 100 rpm, temperatura de 30 °C, vazão da corrente líquida de 50,0 L/h e pressão da corrente gasosa (ar) de 0,6 bar.

Na tentativa de se recuperar um contactor após seu uso em uma fermentação, foram conduzidos testes de secagem dos módulos. Estes testes foram conduzidos com a aplicação de vácuo na carcaça do módulo – em contato com a superfície microporosa das fibras – e a quantidade de água removida foi recolhida em um cristalizador imerso em nitrogênio líquido. A remoção de água de um contactor com 0,15 m² de área após o seu uso em uma fermentação conduzida nas mesmas condições experimentais por 12 dias pode ser observada na Figura 4.15.

Observa-se que, com 20 horas de secagem, foram removidos 25,0 gramas de água. Como toda a água presente na carcaça do contactor foi esgotada antes do teste, é possível afirmar que a água estava contida nos microporos das fibras. Porém, mesmo com essa intensa remoção de água, não foi possível restabelecer a capacidade de oxigenação original das fibras. Seria necessário o uso de uma pressão ainda inferior à usada nestes testes para remover a água presente nos poros de menor diâmetro, utilizando maior quantidade de energia. Assim, o comportamento observado com a utilização de membranas microporosas compostas impede a condução de testes mais

longos e, principalmente, impossibilita a coleta precisa de dados da transferência de oxigênio para o sistema, já que a condição de oxigenação do contactor varia ao longo dos experimentos.

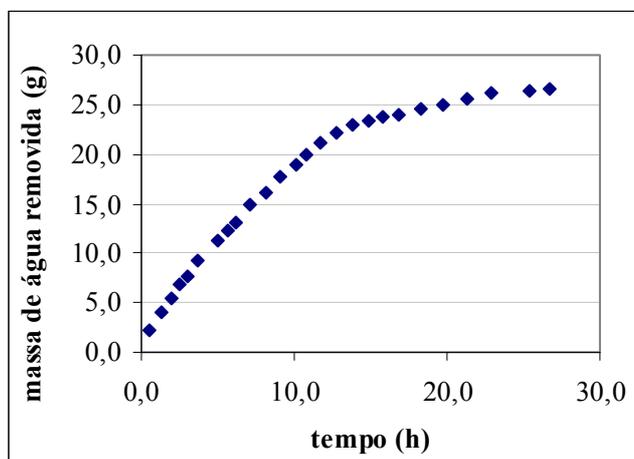


Figura 4.15: Secagem de um contactor de fibras-ocas compostas com silicone após 13 dias de fermentação – massa de água removida (g) por tempo (h).

4.3.3. Fibras Densas

Como mencionado anteriormente, para evitar os problemas na inconstância dos valores dos coeficientes de transferência do oxigênio, fibras densas comerciais de silicone foram também testadas quanto à sua capacidade de oxigenação. Inicialmente foi construído um módulo com $0,24 \text{ m}^2$ de área e sua capacidade de oxigenação foi avaliada através da medição do coeficiente de transferência de massa para o oxigênio da fase gasosa para a fase líquida. Este valor de área foi escolhido por ser de mesma ordem de grandeza dos valores obtidos na simulação. Como as fibras utilizadas neste caso são integralmente densas, o processo não está limitado pela posição da camada superficial densa como nas fibras testadas anteriormente. Assim, o escoamento da fase líquida foi realizado pela carcaça do módulo, externamente às fibras, enquanto que a fase gasosa escoava internamente a elas, já que esta situação favorece a transferência de massa, como visto anteriormente. Foi avaliada a dependência do coeficiente de transferência de massa tanto com a vazão de líquido quanto com a pressão de gás e os resultados estão apresentados na Tabela 4.12.

Como observado nos testes de permeação de gases, os valores obtidos para os coeficientes de transferência de massa são menores do que aqueles inicialmente obtidos para as fibras compostas. Porém eles são equivalentes àqueles obtidos quando os poros daquelas fibras já se encontram preenchidos com água. Assim, estas fibras compostas foram escolhidas para a condução da maior parte dos testes fermentativos, já que seu desempenho é similar às demais e, principalmente, constante ao longo dos testes. Com os dados obtidos nestes testes de oxigenação, foi possível determinar a correlação do coeficiente de transferência de massa com a vazão da corrente líquida. Os dados estão apresentados novamente na Figura 4.16 e a correlação, também obtida com o auxílio do programa *Statistica* (Statistica 6.0, StatSoft, Inc. – Nonlinear Estimation), é apresentada como Equação 4.3.

Tabela 4.12: Variação do coeficiente de transferência de massa em testes de oxigenação com um contactor com fibras densas de silicone.

Q _L (L/h)	P _G (bar)	K _L (m/s) médio
20	0,6	1,55*10 ⁻⁶
20	1,0	1,78*10 ⁻⁶
20	1,4	1,59*10 ⁻⁶
40	0,6	2,57*10 ⁻⁶
40	1,0	2,89*10 ⁻⁶
40	1,4	2,53*10 ⁻⁶
60	0,6	3,74*10 ⁻⁶
60	1,0	3,98*10 ⁻⁶
60	1,4	3,09*10 ⁻⁶
80	0,6	3,58*10 ⁻⁶
80	1,0	3,31*10 ⁻⁶
80	1,4	4,23*10 ⁻⁶
100	0,6	3,12*10 ⁻⁶
100	1,0	3,06*10 ⁻⁶
100	1,4	3,41*10 ⁻⁶

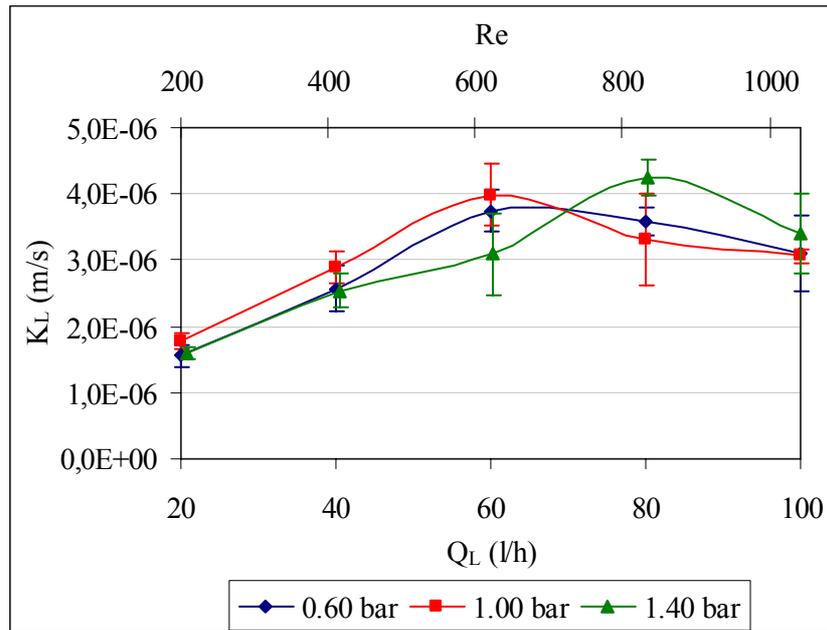


Figura 4.16: Dependência do coeficiente de transferência de massa (K_L , em m/s) na oxigenação de uma corrente líquida com a vazão desta corrente (Q_L , em L/h), com o número de Reynolds (Re) e com a pressão do gás (p , em bar).

$$K_L * 10^6 = 0,091794 * Q_L - 0,0006 * Q_L^2 \quad \text{Equação 4.3}$$

Como esperado, a pressão da corrente gasosa não influencia diretamente o coeficiente de transferência de massa neste processo. Essa variável somente tem influência direta sobre a força motriz da oxigenação. Com o contactor caracterizado, é possível a determinação exata da quantidade de oxigênio transferida no processo. O comportamento do K_L é típico dos processos de transferência de massa e aumenta de forma assintótica com a vazão da corrente líquida e que pode ser encontrado um valor máximo. Este comportamento é análogo ao encontrado durante a simulação do processo, conforme apresentado anteriormente na Figura 4.8. Como discutido, deve-se destacar que com o aumento da velocidade de escoamento há um valor mínimo para a área de membrana, indicando também a presença de um ponto de máximo para o coeficiente de transferência de massa.

4.4. Produção de Ramnolipídeos

4.4.1. Testes Preliminares

A utilização do biorreator com oxigenação por membranas envolve a circulação do meio pelos contactores. Desta forma, anteriormente à condução das fermentações, para avaliar a influência da tensão de cisalhamento provocada pela passagem das células de *Pseudomonas aeruginosa* PA1 pela bomba de engrenagens utilizada para a recirculação, foram conduzidas fermentações em frascos agitados com e sem a circulação do meio. Essas fermentações foram conduzidas em frascos do tipo erlenmeyer com volume de 1,0 litro, fechados com uma rolha porosa para filtrar o ar que entrava em contato com o meio. O volume de meio utilizado foi de 0,3 litro e sua composição foi a mesma definida e apresentada anteriormente no item 3.1.4. Os dados obtidos para o crescimento microbiano ao longo do tempo estão apresentados na Figura 4.17.

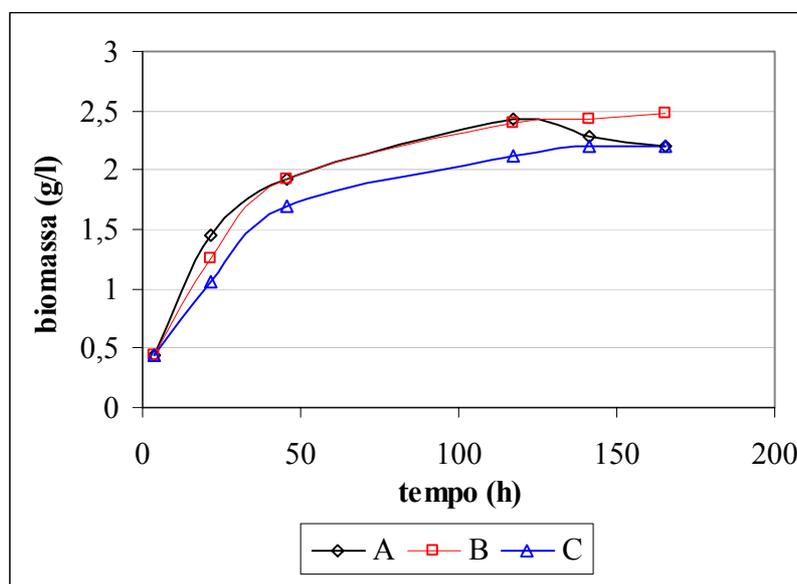


Figura 4.17: Crescimento microbiano de *Pseudomonas aeruginosa* em frascos incubados em um agitador rotatório expresso em concentração de células (g/L) em função do tempo de fermentação (h). Fermentação A: conduzida com a circulação do meio usando uma bomba de engrenagens. Fermentações B e C: sem a circulação do meio – controle.

Pode ser observado que o crescimento microbiano não foi afetado pela passagem contínua das células pela bomba de engrenagens, a uma vazão de 50 L/h. Além disso, a produção de ramnolipídeos foi similar nos três frascos. No frasco com a circulação de células, foi obtida a produtividade de 41,0 mg/L.h, enquanto que nos demais, os valores encontrados foram de 42,1 e 40,3 mg/L.h. Assim, pode-se afirmar que tensão cisalhante causada pela recirculação das células através da bomba de engrenagem não afetou seu comportamento fisiológico em termos de crescimento e produção de ramnolipídeo. Portanto, o sistema proposto pode ser utilizado nos experimentos subsequentes.

Os valores de produtividade obtidos nestas fermentações iniciais em frascos agitados são comparáveis aos encontrados na literatura científica. Os valores variam de 15 mg/L.h (RAHMAN, 2002b) a 260 mg/L.h (HABA, 2000). No entanto, deve-se ressaltar que estes valores de produtividade de ramnolipídeos foram obtidos com diferentes fontes de carbono (óleo de soja e óleo de fritura usado, respectivamente) e, principalmente, com diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Todas as fermentações conduzidas no fermentador com o uso da oxigenação não dispersiva, com o uso de contactores de fibras-ocais, foram reproduzidas em frascos agitados em condições similares. Este procedimento foi adotado para se avaliar continuamente a manutenção da viabilidade microbiana e estabilidade fisiológica dos inóculos utilizados. Uma cinética típica obtida em frascos agitados está ilustrada na Figura 4.18. O aumento de produção do biossurfactante após a fase exponencial de crescimento microbiano revela um comportamento típico de um metabólito secundário, de acordo com o descrito por SANTA ANNA *et al.* (2002).

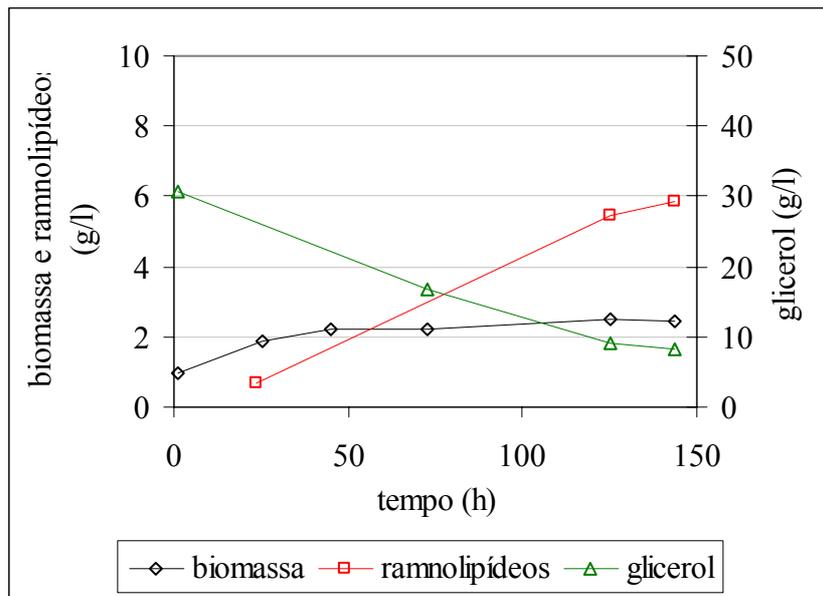


Figura 4.18: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em frascos agitados – crescimento microbiano, produtividade e consumo da fonte de carbono.

Antes de se conduzir os experimentos com a oxigenação não dispersiva proposta neste trabalho, foi realizada uma fermentação em biorreator sem o escoamento da corrente gasosa pelo contactor com membranas, ou seja, o oxigênio fornecido ao meio era apenas o transportado pela superfície do líquido no fermentador. A agitação utilizada foi de 100 rpm, a mesma a ser empregada nos testes subsequentes. O volume de meio e a disposição das pás de agitação foram os mesmos escolhidos para a condução das fermentações. O uso de velocidades de agitação superiores levou à intensa formação de espumas e por isso foi desconsiderado. A Figura 4.19 apresenta os resultados deste teste.

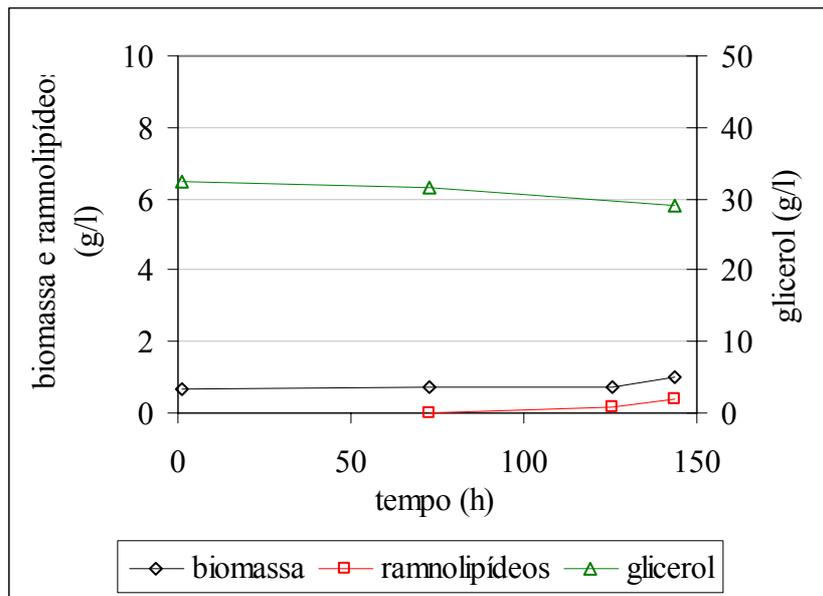


Figura 4.19: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em biorreator sem oxigenação – crescimento microbiano, produtividade e consumo da fonte de carbono.

Nesta fermentação conduzida apenas com aeração superficial a partir de uma mesma concentração inicial de células (inóculo), comparativamente aos frascos agitados (Figura 4.18), observou-se que as células cresceram muito pouco e conseqüentemente o consumo da fonte de carbono (glicerol) e a produção de ramnolipídeos foram muito inferiores ao das fermentações conduzidas com frascos agitados. As Tabelas 4.13 e 4.14 apresentam os parâmetros de fermentação calculados a partir dos dados cinéticos das Figuras 4.18 e 4.19.

Tabela 4.13: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* com oxigenação superficial – biorreator e frasco agitado (biomassa e concentração de produto).

Processo	Biomassa inicial (g/L)	Biomassa com 6 dias (g/L)	Concentração máxima de produto (g/L)
Fermentador	0,7	1,0	0,4
Frasco agitado	0,9	2,4	5,9

Tabela 4.14: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* com oxigenação superficial – biorreator e frasco agitado (produtividade e rendimento).

Processo	Produtividade (mg/L.h)	Consumo de glicerol (mg/L.h)	$Y_{P/S}$ (g de ramnolipídeos por g de glicerol)
Fermentador	2,7	24,3	0,11
Frasco agitado	40,8	161,3	0,25

A concentração celular observada na fermentação conduzida com aeração superficial atingiu valor de 1,0 g/L, enquanto que na fermentação em frasco agitado chegou a 2,4 g/L. A concentração de ramnolipídeos no fermentador não passou de 0,4 g/L enquanto que no frasco agitado atingiu 5,9 g/L. Resultando em produtividades 15 vezes inferiores na fermentação conduzida em biorreator apenas com a oxigenação superficial. A fermentação conduzida em frasco agitado também apresenta fornecimento de oxigênio apenas através da superfície líquida, porém o volume e, principalmente, a altura da coluna de líquido são inferiores, facilitando o acesso de todas as bactérias a este nutriente. Além disso, a agitação nos frascos causa uma grande turbulência na superfície do líquido, facilitando o transporte de oxigênio, enquanto que no biorreator, nas condições em estudo, isto não acontece. Para aumentar a transferência superficial de oxigênio no biorreator, há a necessidade de se aumentar a velocidade de agitação, o que levou a grande formação de espumas pelo fato do vórtice formado atingir as pás do agitador.

Este experimento indicou, similarmente aos resultados obtidos por SANTOS (2003), que a escassez de oxigênio levou as células a utilizar o nitrato como acceptor final de elétrons num processo de respiração anaeróbia. Nesta condição fisiológica esta cepa não é capaz de crescer e produzir o biossurfactante com eficiência. A necessidade da presença do oxigênio para o crescimento e para a produção adequada de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* também foi reportada anteriormente por BENINCASA *et al.* (2002) e BEYENAL *et al.* (2003). Assim, iniciou-se a condução dos demais experimentos.

4.4.2. Testes Preliminares com Oxigenação por Membranas

A primeira e mais clara observação na produção de ramnolipídeos com o uso da oxigenação não dispersiva através de membranas é a ausência de espuma no vaso contendo o meio fermentado durante o processo fermentativo. A comparação entre a produção realizada com contactores e uma produção com aeração convencional pode ser observada na Figura 4.20.

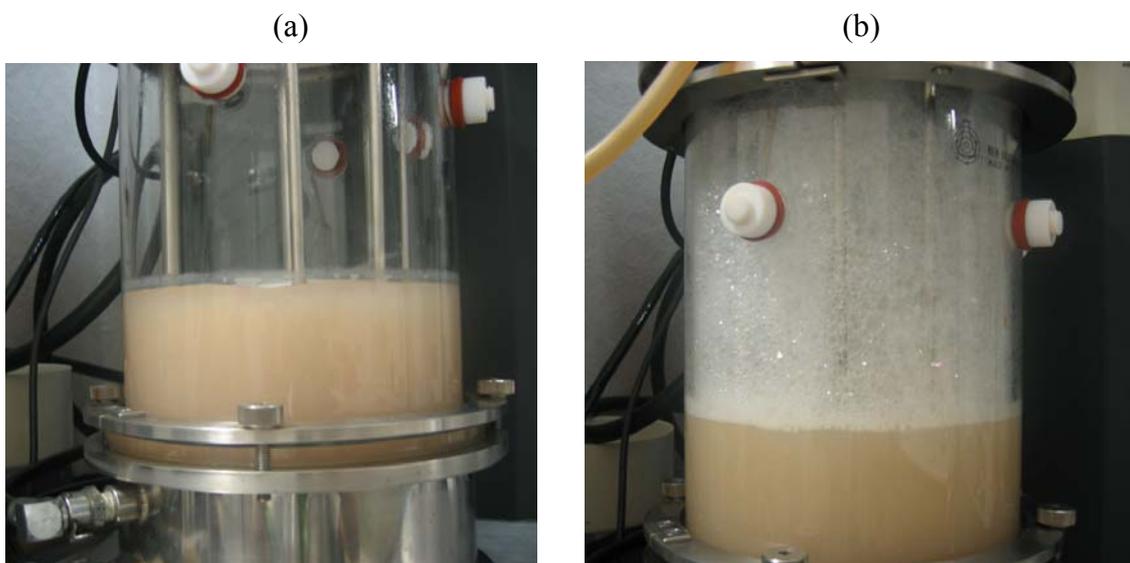


Figura 4.20: Comparação entre a produção de ramnolipídeos utilizando a oxigenação convencional e a oxigenação por contactores com membranas, proposta no presente trabalho. (a) Oxigenação não dispersiva. (b) Oxigenação dispersiva convencional.

Nota-se a ausência de espuma na Figura 4.20 (a), correspondente à fermentação com oxigenação por membranas. Para descartar a possibilidade da ausência de espuma estar relacionada à inexistência de biossurfactante nesse meio de fermentação, neste foi injetado ar comprimido diretamente por um dispersor, com baixa vazão, simulando a oxigenação convencional. Em poucos segundos foi obtida a condição vista na Figura 4.20 (b). Isto demonstra a dificuldade operacional da condução deste processo fermentativo de produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* pelos métodos de oxigenação tradicionais.

Para o acompanhamento das fermentações, foram realizadas análises periódicas na concentração de células no meio e nas concentrações da fonte de carbono (glicerol) e do produto. Como a maior alteração no processo produtivo consistia na oxigenação do meio, atenção especial foi dispensada à concentração de oxigênio dissolvido, com seus valores registrados continuamente com o uso de um computador acoplado ao fermentador.

Na primeira fermentação, a concentração de oxigênio deveria ser mantida aproximadamente em 4,0 mg/L. O controle dessa concentração de oxigênio foi realizado manualmente através de alterações na pressão da corrente gasosa usada para a transferência e na vazão da corrente líquida através do contactor. O aumento de qualquer uma dessas duas variáveis causa a elevação na quantidade de oxigênio transferida ao meio. Nessa fermentação, o nível de oxigênio dissolvido pôde ser mantido com o uso de uma corrente de ar como fase gasosa no contactor com membranas.

A produção de ramnolipídeos, o consumo da fonte de carbono e o crescimento celular na primeira fermentação estão apresentados na Figura 4.21.

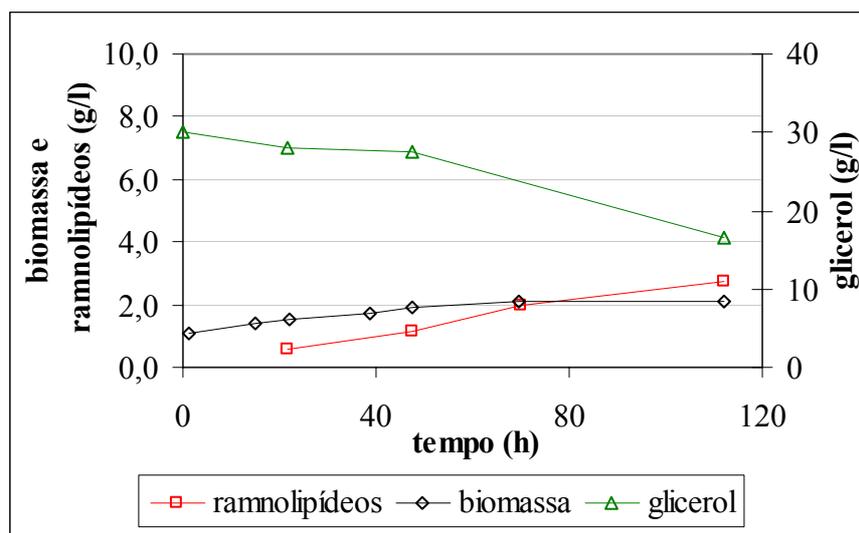


Figura 4.21: Primeira fermentação – crescimento da biomassa (g/L), produção de ramnolipídeos (g/L) e consumo de glicerol (g/L).

A Tabela 4.15 apresenta os parâmetros de fermentação calculados a partir dos dados cinéticos da Figura 4.21. A utilização de uma concentração de inóculo próxima a 1,0 g/L, diminuiu a fase de adaptação dos microorganismos. Entretanto, o crescimento ocorreu de forma lenta. A produção de ramnolipídeos se manteve constante até o final do experimento, a uma taxa de 24,3 mg/L.h, atingindo 2,7 g/L com 110 horas de fermentação. A taxa de consumo da fonte de carbono (glicerol) foi igual a 119,9 mg/L.h.

Tabela 4.15: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em biorreator com oxigenação por membranas.

Biomassa inicial (g/L)	1,1
Biomassa com 5 dias (g/L)	2,1
Concentração máxima de produto (g/L)	2,7
Produtividade (mg/L.h)	24,3
Consumo de glicerol (mg/L.h)	119,9
$Y_{P/S}$ (g de ramnolipídeos por g de glicerol)	0,20

O rendimento desta fermentação ($Y_{P/S}$) foi de 0,20 grama de ramnolipídeo por grama de glicerol. A concentração de células atingiu 2,1 g/L no final do experimento. Como essa produção foi interrompida com pouco mais de 110 horas devido a problemas de falta de energia elétrica, não se pode afirmar que foi atingida a concentração máxima de células possível para aquelas condições, assim como se a produtividade volumétrica dos biossurfactantes manter-se-ia constante. Outro importante ponto observado foi a dificuldade na manutenção de um valor estável para a concentração de oxigênio dissolvido do meio fermentado. O perfil de concentração de oxigênio durante a fermentação está apresentado na Figura 4.22. Os valores da concentração de oxigênio são apresentados como a média de 20 minutos de fermentação.

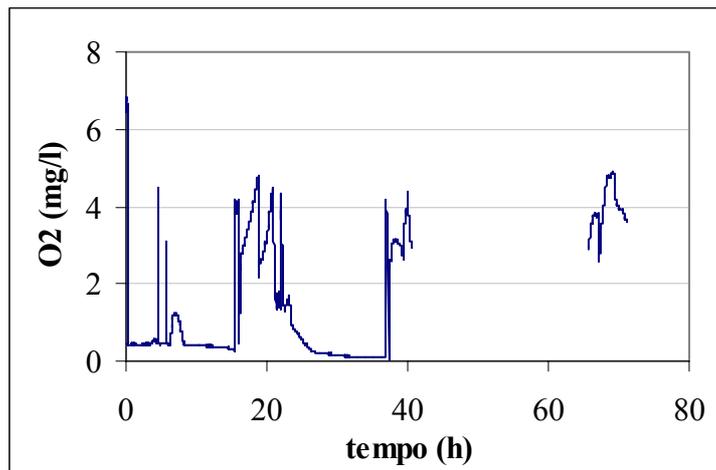


Figura 4.22: Concentração de oxigênio dissolvido no meio fermentado (em mg/L) ao longo da primeira fermentação realizada para a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*.

Nesta figura, observa-se que até aproximadamente 15 horas de fermentação, a concentração de oxigênio dissolvido apresentou valores próximos a zero. Apesar do crescimento da biomassa na fermentação no biorreator ter sido semelhante àquele obtido com o uso de frascos agitados, a taxa de produção de ramnolipídeos foi 40 % inferior. Resultados similares foram obtidos por JEONG *et al.* (2004), que reportaram uma queda na produtividade volumétrica de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* de 34 % (de 47 mg/L.h para 31 mg/L.h), quando os experimentos foram conduzidos em um biorreator comparativamente aos frascos agitados. Este fato pode estar relacionado tanto com o aumento de volume da reação, quanto esta mudança no fornecimento do oxigênio. Deste modo, a ineficiência de transferência de forma regular do oxigênio para o metabolismo celular pode ter prejudicado a fisiologia microbiana e conseqüentemente a produção de biossurfactante neste experimento. GRUBER *et al.* (1993) mostraram que uma alta produtividade volumétrica de ramnolipídeos (545 mg/L.h) pode ser obtida com o uso de um sistema de oxigenação similar. Porém, os autores utilizaram um sistema de reciclo celular, e conseqüentemente, permitiram a operação do fermentador em condição de alta densidade celular (até 13,3 g/L). Porém, os autores também utilizaram a oxigenação convencional por borbulhamento para a obtenção desse alto valor de produtividade. Assim, novos testes foram realizados, com a tentativa de se melhor controlar a concentração de oxigênio dissolvido no meio.

Após o término desta fermentação observou-se uma grande perda de eficiência do módulo de oxigenação, provavelmente pela condensação de água nos poros do suporte das fibras. Assim, com o objetivo de minimizar o efeito da redução do coeficiente de transferência de massa com o tempo de operação, nas demais fermentações, oxigênio puro foi utilizado como fase gasosa no contactor. Esta estratégia possibilitou que a concentração de oxigênio dissolvido fosse mantida acima de zero em quase todo processo fermentativo.

O perfil da concentração de oxigênio dissolvido ao longo de uma fermentação conduzida com a oxigenação por membranas e com o uso do gás oxigênio puro na alimentação é apresentado na Figura 4.23. Observou-se que a concentração de oxigênio permaneceu com valor igual à zero até aproximadamente 20 horas de fermentação. Nesse período inicial, a demanda de oxigênio superou o fornecimento, coincidindo com a fase de crescimento mais acentuado da biomassa nessa fermentação. Novamente pode ser notada a dificuldade em se manter um valor constante para a concentração de oxigênio dissolvido no meio de fermentação.

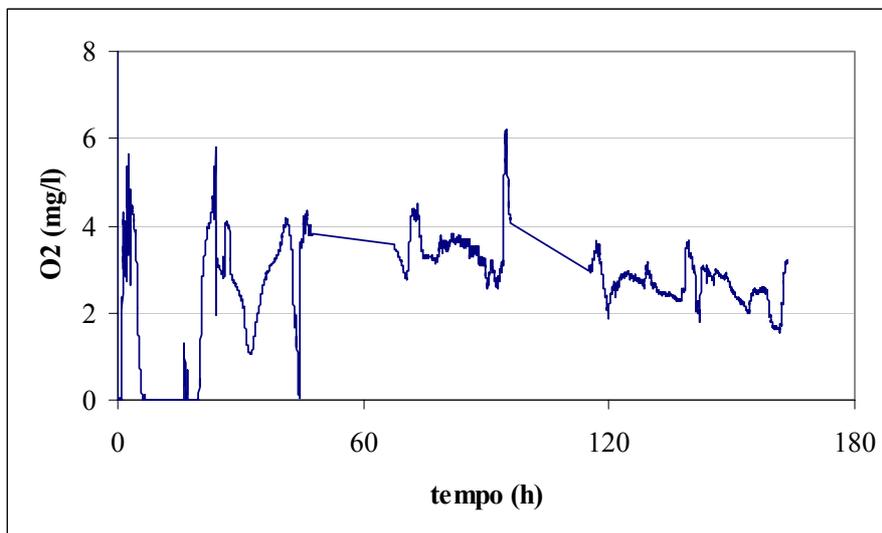


Figura 4.23: Concentração de oxigênio dissolvido no meio fermentado (em mg/L) ao longo da segunda fermentação realizada para a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*.

Provavelmente, o efeito da condensação de vapor de água nos poros, mesmo com o uso de oxigênio puro, dificulta o controle da concentração de oxigênio, especialmente quando a taxa de consumo do gás pelos microorganismos era superior ao fornecimento do mesmo através das fibras. Além da necessidade de se minimizar a condensação de água no interior do suporte poroso, através do aumento da vazão do gás que escoava pelo contactor, estabeleceu-se o procedimento de secagem do oxigenador de membranas após cada fermentação para possibilitar a manutenção de uma condição de oxigenação próxima à inicial.

Nos experimentos subsequentes, tentou-se reproduzir uma fermentação para a produção de biossurfactantes, com menor variação na concentração de oxigênio dissolvido e com pequenas variações na concentração inicial de células. Também foi conduzida uma nova fermentação em frasco agitado para a devida comparação com o biorreator com membranas. Os perfis típicos de concentração de células, ramnolipídeos e glicerol de uma fermentação em biorreator podem ser observados na Figura 4.24.

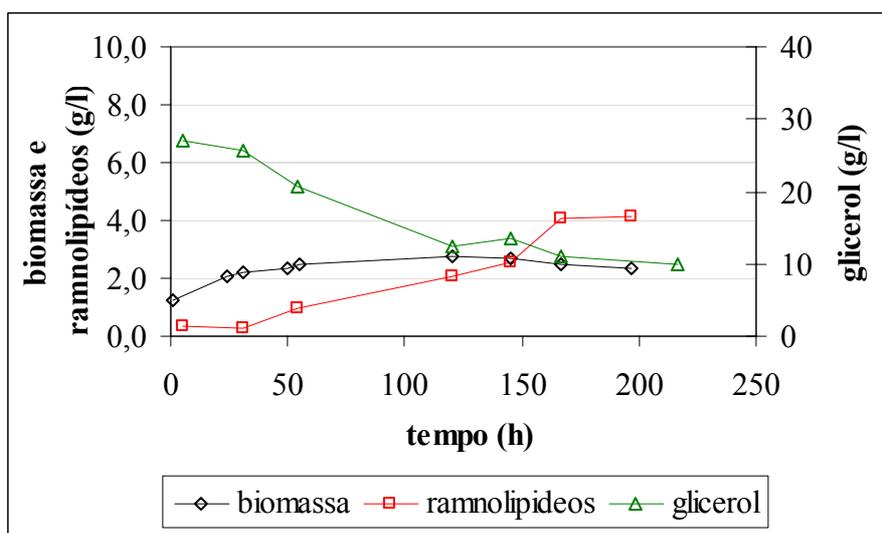


Figura 4.24: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em fermentador – oxigenação com fibras compostas de silicone.

Nas Figuras 4.25, 4.26 e 4.27 estão, respectivamente, os perfis obtidos para o crescimento microbiano, produção de ramnolipídeos e consumo de glicerol das fermentações conduzidas em fermentador e no frasco agitado.

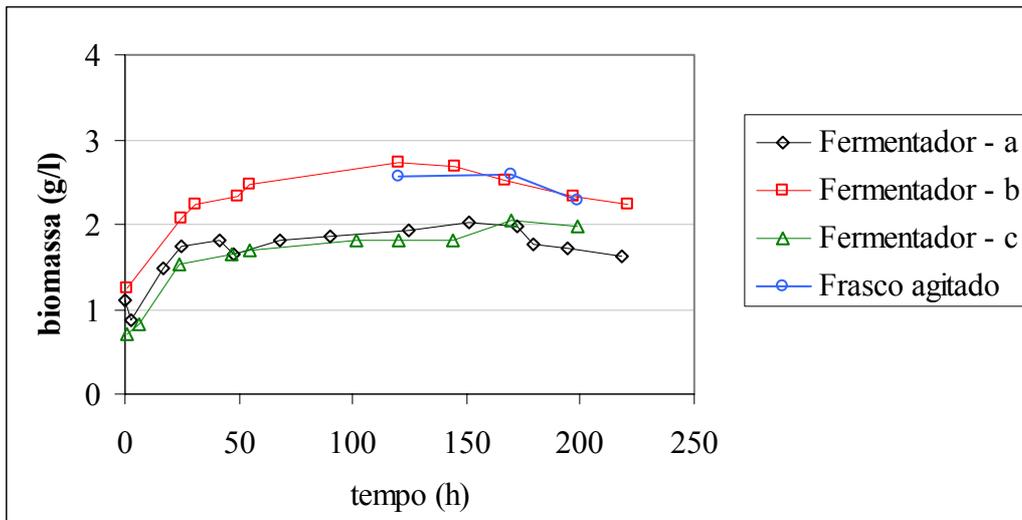


Figura 4.25: Gráfico comparativo do crescimento microbiano durante a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – fermentações em biorreator e em frasco agitado.

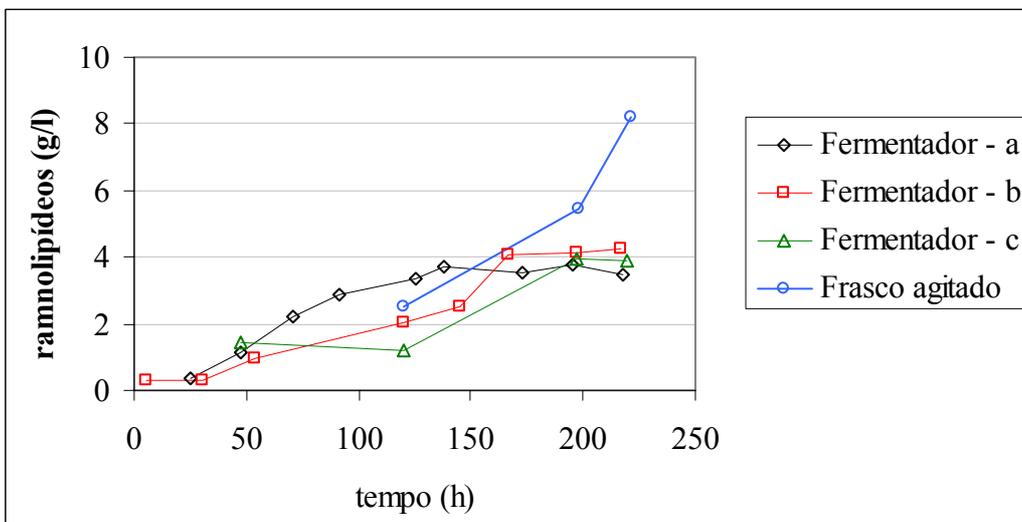


Figura 4.26: Gráfico comparativo da produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – fermentações em biorreator e em frasco agitado.

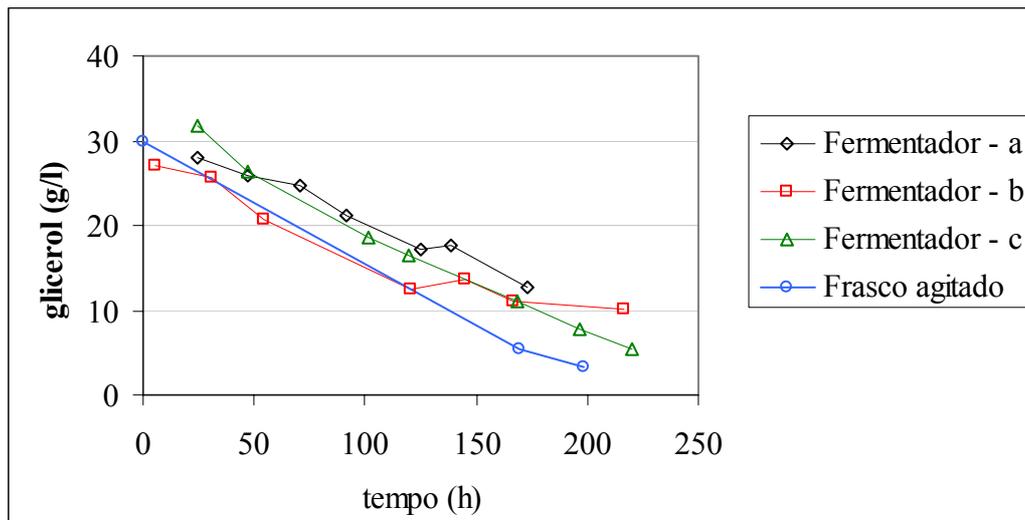


Figura 4.27: Gráfico comparativo do consumo da fonte de carbono durante a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – fermentações em biorreator e em frasco agitado.

As fermentações a, b e c foram conduzidas sob as mesmas condições experimentais, apenas com pequena variação na concentração inicial de células. Os perfis de concentração de biomassa, ramnolipídeos e glicerol foram semelhantes, tanto nas fermentações conduzidas no biorreator, quanto na fermentação no frasco agitado. Os parâmetros e dados relativos a essas fermentações são apresentados nas Tabelas 4.16 e 4.17.

Tabela 4.16: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – biorreator e frasco agitado (biomassa e concentração de produto).

Processo	Biomassa inicial (g/L)	Biomassa com 7 dias (g/L)	Concentração máxima de produto (g/L)
Fermentador – a	1,1	2,0	3,8
Fermentador – b	1,2	2,5	4,1
Fermentador – c	0,7	2,0	4,0
Frasco agitado	0,7	2,6	8,2

Tabela 4.17: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – biorreator e frasco agitado (produtividade e rendimento).

Processo	Produtividade (mg/L.h)	Consumo de glicerol (mg/L.h)	$Y_{P/S}$ (g de ramnolipídeos por g de glicerol)
Fermentador – a	26,4	107,1	0,25
Fermentador – b	20,8	94,8	0,22
Fermentador – c	20,3	130,1	0,16
Frasco agitado	37,1	138,3	0,27

Pelos resultados obtidos nas fermentações conduzidas em biorreator, pode-se concluir que a variação da concentração do inóculo (de 0,7 para 1,2 g/L) praticamente não apresentou influência sobre a concentração máxima de ramnolipídeos obtida. Porém, um maior consumo de glicerol (cerca de 30 %) foi observado na fermentação conduzida com menor concentração de inóculo (0,7 g/L) no biorreator. Isto se refletiu diretamente sobre o baixo rendimento de substrato em produto ($Y_{P/S}$) desta fermentação. Uma observação sobre a variação experimental encontrada nestes experimentos pode ser feita sobre as Fermentações “a” e “b”. Na Fermentação “b”, a concentração de células alcançou valor 25 % superior, e na Fermentação “a”, a produtividade de ramnolipídeos, expressa em miligrama de produto por litro por hora, foi 27 % maior. Enquanto que a diferença no consumo de glicerol foi de apenas 11 %. Assim, foi observado que, para as mesmas condições experimentais, houve uma leve alteração no metabolismo celular entre as fermentações, favorecendo ou o crescimento celular ou a produção do biossurfactante.

Porém, a produtividade obtida na fermentação em frasco agitado ainda se mostrou superior às demais. E os valores obtidos para a taxa volumétrica de produção de ramnolipídeos ainda são inferiores aos observados por BENINCASA *et al.* (2002), 200 mg/L.h, REILING *et al.* (1986), 147 mg/L.h, ou por GRUBER *et al.* (1993), 545 mg/L.h, também com a utilização de *Pseudomonas aeruginosa*. Porém, a cepa utilizada no presente trabalho ainda não foi geneticamente modificada e o processo produtivo pode ser melhorado.

Para tentar minimizar os inconvenientes da irregularidade do comportamento das fibras compostas quanto à oxigenação, optou-se pelo uso das fibras densas de silicone.

Assim, foi realizada uma nova fermentação para a produção de ramnolipídeos, procurando-se manter as condições descritas para as fermentações anteriores. Os dados para o acompanhamento desta fermentação são apresentados na Figura 4.28.

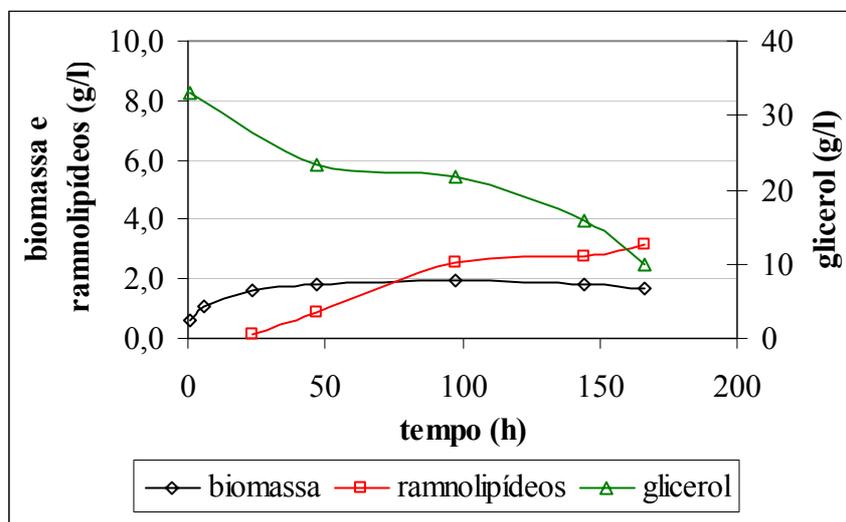


Figura 4.28: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em fermentador – uso de fibras densas de silicone para oxigenação.

O objetivo também foi a manutenção da concentração de oxigênio no meio em 4,0 mg/L. A concentração inicial de células nesta fermentação foi igual a 0,6 g/L. Os resultados obtidos mostraram uma concentração máxima de ramnolipídeos de 3,5 g/L, com produtividade igual a 18,8 mg/L.h. O consumo de glicerol foi igual a 122,9 mg/L.h, resultando em um rendimento – $Y_{P/S}$ – de 0,15 grama de biossurfactante por grama de glicerol. Nas Tabelas 4.18 e 4.19, estão apresentados os dados obtidos em duas fermentações realizadas em iguais condições, apenas com a mudança no tipo de fibra utilizada para o fornecimento de oxigênio, composta ou densa. Nota-se que não ocorre variação dos parâmetros estudados entre as duas fermentações.

Tabela 4.18: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – avaliação do tipo de fibra utilizado na oxigenação (biomassa e concentração de produto).

Processo	Biomassa inicial (g/L)	Biomassa com 7 dias (g/L)	Concentração máxima de produto (g/L)
Fibras compostas	0,7	2,0	4,0
Fibras densas	0,6	1,7	3,5

Tabela 4.19: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – avaliação do tipo de fibra utilizado na oxigenação (produtividade e rendimento).

Processo	Produtividade (mg/L.h)	Consumo de glicerol (mg/L.h)	$Y_{P/S}$ (g de ramnolipídeos por g de glicerol)
Fibras compostas	20,3	130,1	0,16
Fibras densas	18,8	122,9	0,15

Mesmo com o uso das fibras densas de silicone para a oxigenação, o controle manual da concentração de oxigênio dissolvido no biorreator se mostrou extremamente difícil e impreciso, impossibilitando a sua manutenção em um valor constante, como ilustrado na Figura 4.29, e como já observado anteriormente (Figura 4.23) para o uso das fibras compostas.

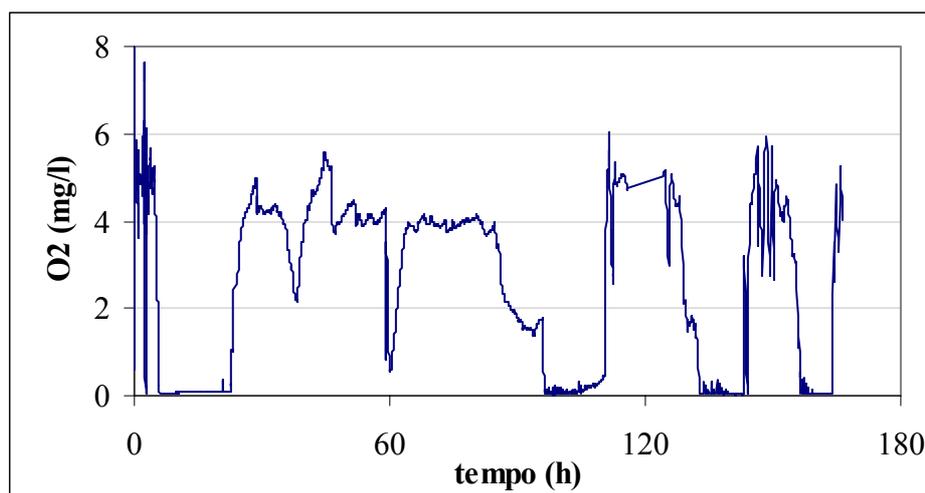


Figura 4.29: Perfil da concentração de oxigênio dissolvido ao longo de uma fermentação – oxigenação realizada com o uso de fibras-ocas densas de silicone.

Em trabalhos anteriores (MULLIGAN e GIBBS, 1989, HABA *et al.*, 2000, BENINCASA *et al.*, 2002, TAVARES, 2007), observou-se uma taxa elevada de consumo da fonte de nitrogênio, a qual, em poucas horas, é totalmente consumida. Assim, a adição suplementar deste nutriente pode possibilitar estender a fase exponencial de crescimento celular, elevando a concentração de células no meio e, conseqüentemente, a produção de ramnolipídeos (SANTOS, 2003, TAVARES, 2007). Desta forma, investigou-se a possibilidade de aumentar a produtividade com adição

suplementar da fonte de nitrogênio (nitrato de sódio) em 24 e em 48 horas a partir do início da fermentação. Os dados desta fermentação estão apresentados na Figura 4.30.

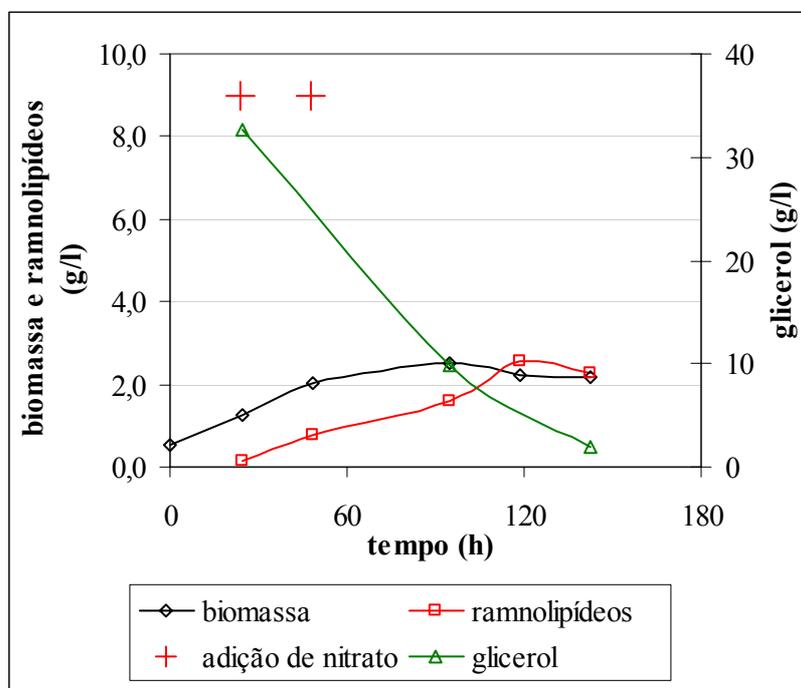


Figura 4.30: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em fermentador – adição suplementar de nitrogênio em 24 e 48 horas.

Para a devida comparação, também foi conduzida uma fermentação em frasco agitado com a adição extra de nitrato. A comparação dos resultados obtidos nas fermentações com e sem a adição suplementar de nitrato está apresentada nas Tabelas 4.20 e 4.21.

Tabela 4.20: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – com e sem adição suplementar de nitrato (biomassa e concentração de produto).

Processo	Biomassa inicial (g/L)	Biomassa com 7 dias (g/L)	Concentração máxima de produto (g/L)
Fermentador	0,6	2,0	2,7
Fermentador + NO ₃ ⁻	0,5	2,2	2,6
Frasco agitado	0,7	2,6	8,2
Frasco agitado + NO ₃ ⁻	0,6	2,3	9,6

Tabela 4.21: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – com e sem adição suplementar de nitrato (produtividade e rendimento).

Processo	Produtividade (mg/L.h)	Consumo de glicerol (mg/L.h)	$Y_{P/S}$ (g de ramnolipídeos por g de glicerol)
Fermentador	18,8	94,7	0,20
Fermentador + NO_3^-	21,8	166,4	0,13
Frasco agitado	37,1	138,3	0,27
Frasco agitado + NO_3^-	50,5	124,3	0,41

Nos experimentos conduzidos em biorreator, não foi observada alteração significativa no crescimento celular ou na produção de biossurfactantes com a adição extra da fonte de nitrogênio. Contudo, no experimento conduzido com a adição suplementar de nitrato, houve uma elevação de 75 % no consumo de glicerol. Assim, o rendimento desta fermentação foi inferior ao obtido na fermentação conduzida sem adição deste substrato. Este resultado é diferente do obtido por TAVARES (2007), onde foi observado o aumento da concentração de células e, conseqüentemente, o aumento da produção de ramnolipídeos. Porém, essa produção era realizada em um sistema completamente distinto, em biorreator com apenas 0,6 litro, com oxigenação convencional por borbulhamento e a adição de anti-espumantes.

Por outro lado, nas fermentações conduzidas em frascos agitados, a adição extra de nitrato ocasionou um aumento na produtividade e rendimento de substrato em produto 52 % maior (Tabela 4.21).

Este comportamento pode estar diretamente relacionado com a diferente forma de se suprir oxigênio ao meio. Mesmo em menor quantidade, a taxa de oxigenação em um frasco agitado é praticamente constante durante toda a fermentação, enquanto que no fermentador com a oxigenação através do contactor de membranas, observou-se variação durante todo o experimento (Figuras 4.23 e 4.29). Além disso, a variação abrupta nos valores de oxigênio dissolvido durante a fermentação, além de impossibilitar determinação correta do consumo de oxigênio pelas bactérias, ainda pode afetar o metabolismo oxidativo e conseqüentemente o comportamento fisiológico desta bactéria durante o processo fermentativo.

4.4.3. Testes com Controle da Concentração de Oxigênio

Para tentar contornar estes problemas, um novo sistema de oxigenação foi projetado e construído, utilizando-se um Controlador Lógico Programável (CLP OCS, GE Fanuc). Como citado anteriormente, a taxa de fornecimento de oxigênio pode ser variada alterando-se a vazão da corrente líquida que escoa pelo contactor ou a pressão da corrente gasosa que escoa pelo lado oposto das membranas.

O fluxograma do processo para o controle através do programa supervisorio utilizado está apresentado na Figura 4.31.

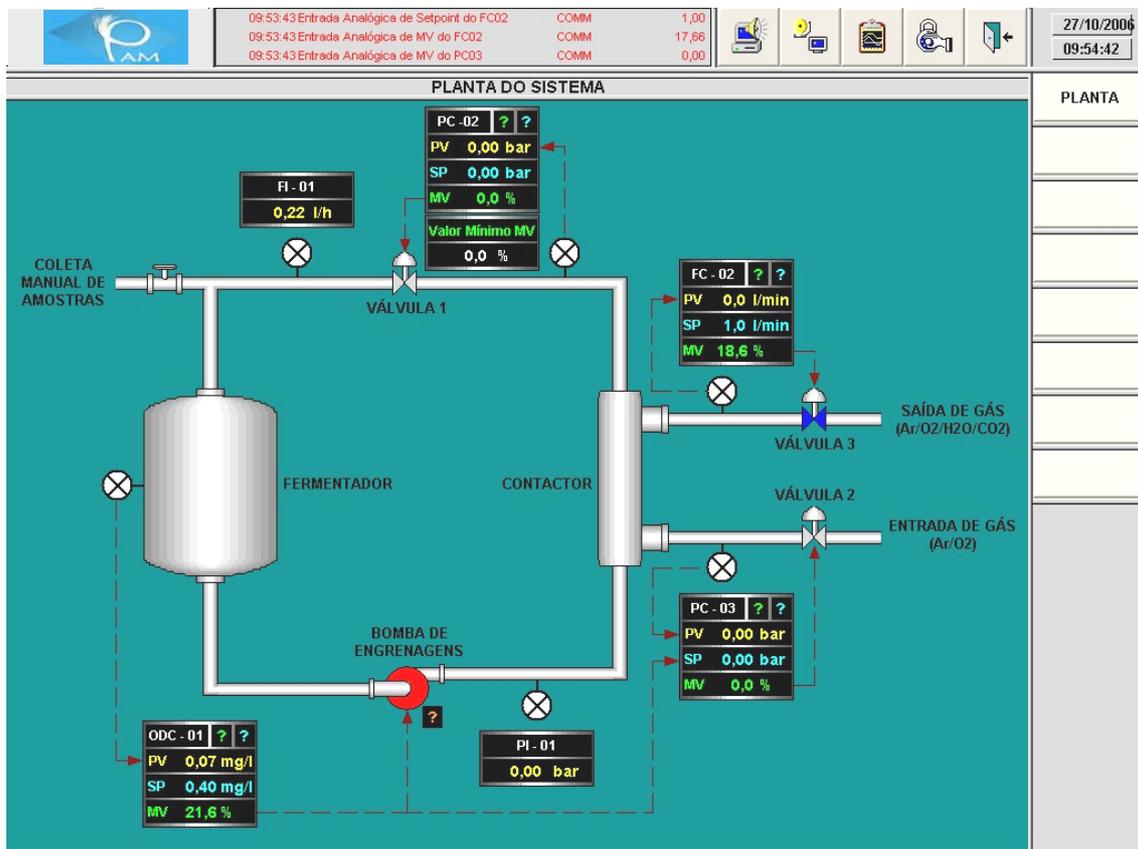


Figura 4.31: Fluxograma do sistema de oxigenação no programa supervisorio.

O funcionamento do sistema pode ser exemplificado pelas Figuras 4.32 e 4.33, onde estão apresentados os perfis de concentração de oxigênio dissolvido e de pressão de gás e os gráficos de atuação do CLP sobre o sistema de oxigenação.



Figura 4.32: Atuação do controlador sobre a bomba de engrenagens para a regulação da concentração de oxigênio dissolvido. Curva azul – valor desejado para o oxigênio dissolvido; curva amarela – valor medido; curva verde – atuação sobre a bomba.



Figura 4.33: Atuação do controlador sobre a válvula de entrada (v2) para a regulação da concentração de oxigênio dissolvido. Curva azul – valor estabelecido para a pressão de gás pelo CLP; curva amarela – valor medido; curva verde – atuação sobre a válvula.

Na Figura 4.32 observa-se que a atuação sobre a bomba leva a uma resposta direta na variável de interesse, a concentração de oxigênio dissolvido. Esta é a primeira etapa de controle. Se a atuação sobre a vazão da corrente líquida não for suficiente para atender à demanda do sistema, o CLP atua sobre a válvula que controla a pressão de gás. Essa atuação é indireta, pois o controlador define incrementos (ou decrementos) para a pressão de gás e a atuação sobre a válvula é realizada para atender aos novos requisitos do sistema (Figura 4.33). Essa variação na pressão do gás altera, então, a taxa de transferência de oxigênio, sendo refletida na concentração de oxigênio dissolvido no meio. Outras duas malhas de controle implementadas são secundárias, controlando a vazão de purga da corrente gasosa, através da válvula v3, e a pressão da corrente líquida, válvula v1.

Assim, na primeira fermentação conduzida com o novo sistema de controle da concentração de oxigênio dissolvido, pode-se observar a diferença no perfil de oxigênio ao longo da fermentação, se comparado com as fermentações anteriores com o controle manual. Esse novo perfil, para uma fermentação onde a concentração de oxigênio desejada era igual a 4,0 mg/L, está apresentado na Figura 4.34. Os valores foram coletados com intervalo de 10 segundos e também estão apresentados como a média de 20 minutos.

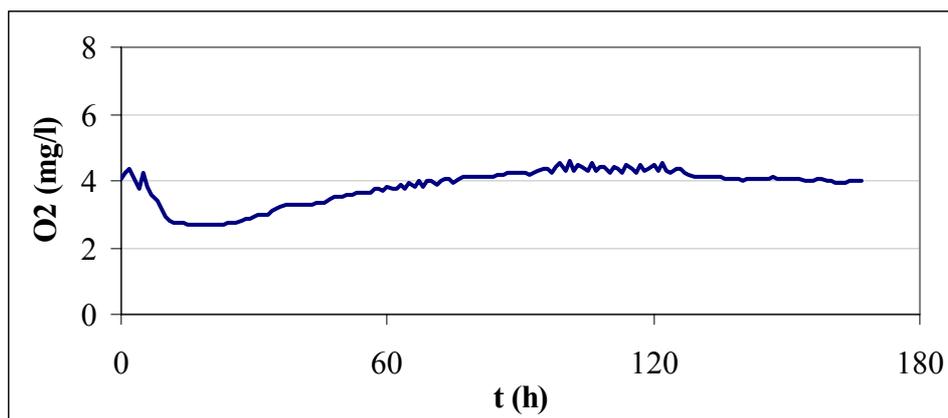


Figura 4.34: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – oxigênio dissolvido no meio de fermentação (em mg/L) ao longo da fermentação.

Com o sistema de controle implementado, foi possível avaliar a influência da concentração de oxigênio dissolvido no meio de fermentação sobre a cinética de produção de ramnolipídeo por *Pseudomonas aeruginosa* PA1.

Foram conduzidas fermentações com concentrações de oxigênio dissolvido mantidas em valores em torno de 1,0, 4,0 e 6,0 mg/L. Esses valores correspondem, respectivamente, a 14 %, 57 % e 86 % da concentração de saturação de oxigênio que, nas condições definidas para as fermentações, era igual a 7,0 mg/L.

Como todo o oxigênio era fornecido para o meio através do sistema não dispersivo, não havia borbulhamento, e a perda desse nutriente para o ambiente era desprezível, foi possível afirmar que a quantidade do gás fornecida, conhecida pela caracterização prévia do sistema utilizado, era exatamente igual à quantidade consumida pelas bactérias. Isso possibilitou a análise das taxas global de consumo de oxigênio (OUR – *Oxygen Uptake Rate*), expressa em miligrama de oxigênio por litro por hora, e específica (SOUR – *Specific Oxygen Uptake Rate*), expressa em miligrama de oxigênio por grama de células por hora. A taxa específica foi obtida pela divisão da taxa bruta pela concentração de células durante a fermentação. Os valores da concentração celular com intervalo de tempo compatível com os valores de consumo foram obtidos pela interpolação dos pontos coletados.

Na Figura 4.35 são apresentadas as taxas global e específica de consumo de oxigênio durante uma fermentação com concentração de oxigênio dissolvido no meio igual a 4,0 mg/L.

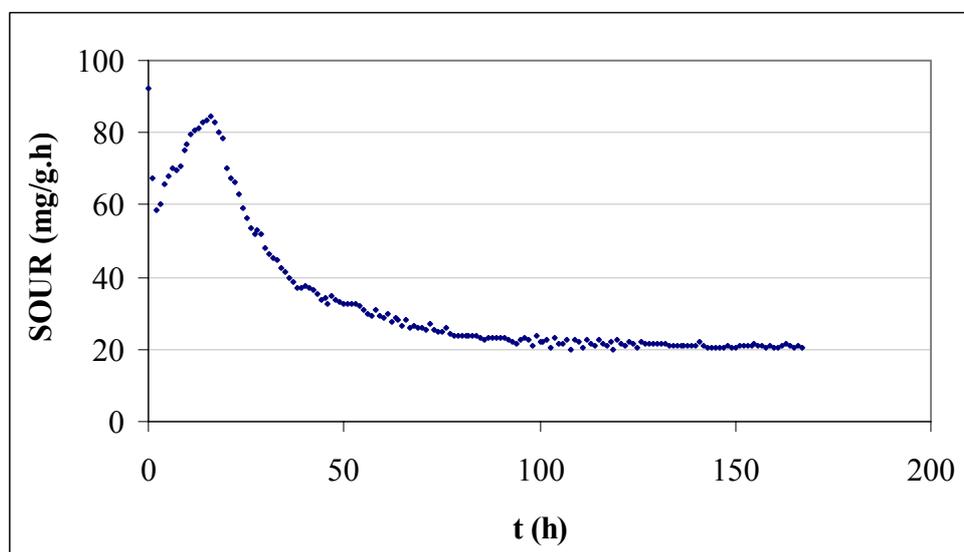
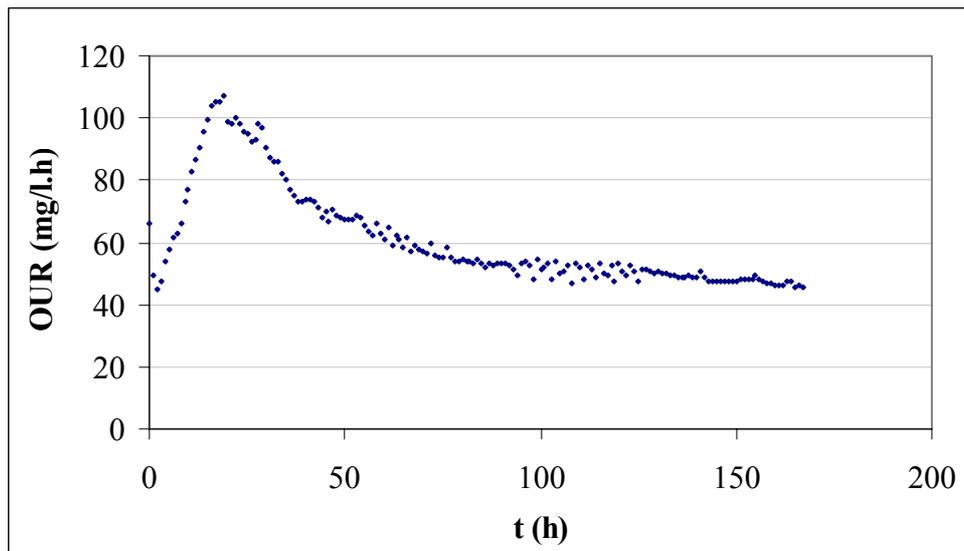


Figura 4.35: Taxas de consumo de oxigênio bruta (OUR – *Oxygen Uptake Rate*), expressa em miligrama de oxigênio por litro por hora, e específica (SOUR – *Specific Oxygen Uptake Rate*), expressa em miligrama de oxigênio por grama de células por hora ao longo de uma fermentação para a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – média de 20 minutos.

Nesta fermentação, observa-se claramente a variação no consumo de oxigênio ao longo das diferentes fases do metabolismo celular. Após a fase de adaptação, que dura no máximo 4 horas, ocorre um significativo aumento no consumo total de oxigênio, OUR, que varia de 40,0 mg/L.h até valores acima de 100,0 mg/L.h. Depois, esse valor cai lentamente até a estabilização em um valor próximo ao inicial. Esse comportamento

também é observado para a taxa específica, SOUR, o que confirma que essa variação não está somente relacionada à mudança nos valores de concentração celular, mas também a atividade metabólica das células nos diferentes estágios do crescimento. A taxa específica apresenta um aumento de um valor inicial de 60,0 mg/g.h até 85,0 mg/g.h, caindo depois para um valor em torno de 20,0 mg/g.h. Esta variação nas taxas de consumo de oxigênio está de acordo com o observado por GOMEZ *et al.* (2006) para o crescimento de *Pseudomonas putida* em glicose e glicerol em um biorreator. Os valores das taxas de consumo deste nutriente obtidos para as fermentações com diferentes concentrações de oxigênio dissolvido apresentaram apenas pequenas variações, como pode ser observado na comparação apresentada na Figura 4.36. Estes valores são muito inferiores aos apresentados por GOMEZ *et al.* (2006), que obtiveram valor máximo para a taxa específica acima de 500 mg/g.h e valor de estabilização, depois de 50 horas, em torno de 50 mg/g.h. Ainda, os valores apresentados no presente trabalho também são inferiores aos obtidos por BEYENAL *et al.* (2003), de cerca de 400 mg/g.h.

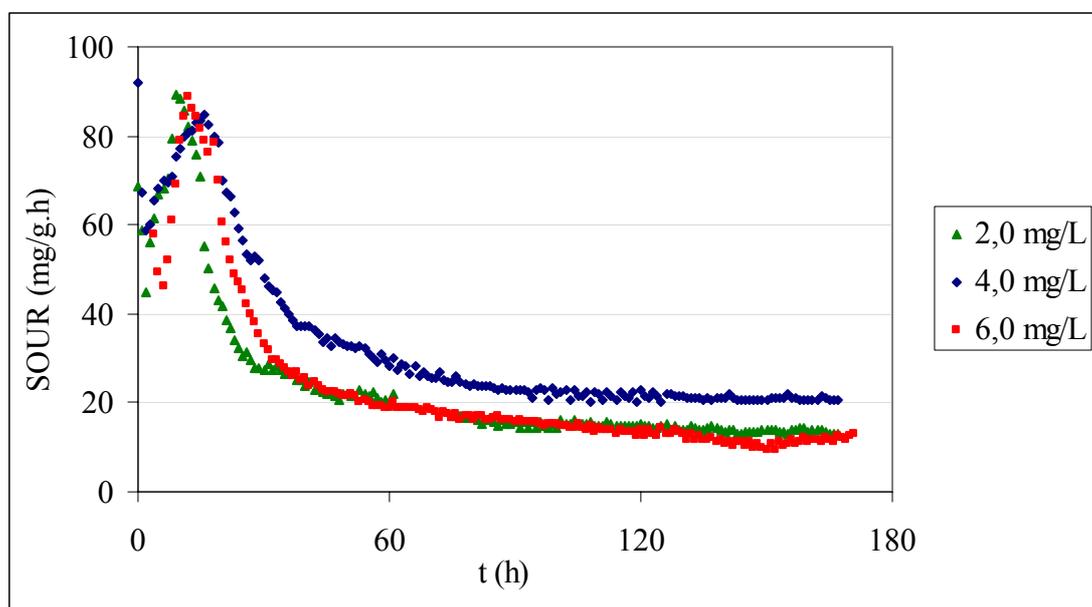


Figura 4.36: Taxa específica de consumo de oxigênio (SOUR – *Specific Oxygen Uptake Rate*), expressa em miligrama de oxigênio por grama de células por hora ao longo de uma fermentação para a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*.

Assim, conclui-se que, na fase estacionária de crescimento e para as condições estabelecidas nestes experimentos, a taxa de consumo de oxigênio das células de *Pseudomonas aeruginosa* PA1 apresenta valor entre 13,0 e 20,0 miligramas por grama de células por hora, sendo este nutriente importante também para a manutenção celular.

Outro interessante fato observado foi que o perfil de consumo de oxigênio se manteve inalterado com a variação da concentração de oxigênio dissolvido, ajustada para 1,0, 4,0 ou 6,0 mg/L.

A cinética de crescimento celular e produção de ramnolipídeos para a condição de oxigenação com concentração de oxigênio dissolvido igual a 4,0 mg/L encontra-se descrita na Figura 4.37.

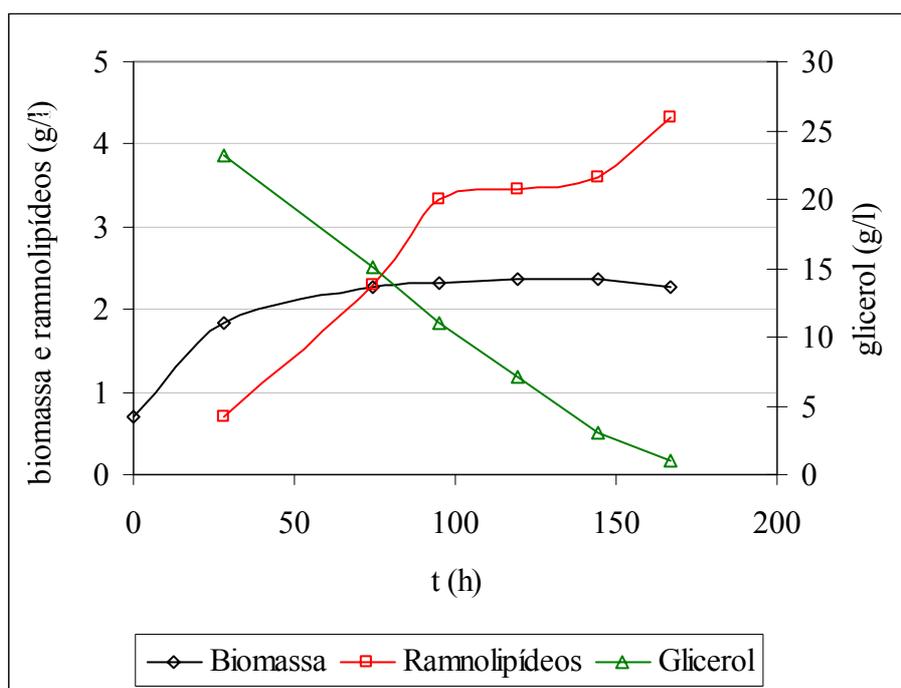


Figura 4.37: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em fermentador – concentração de oxigênio dissolvido mantida em 4,0 mg/L.

Para efeito comparativo, os dados relativos ao crescimento microbiano, à produção de células e ao consumo de glicerol para as fermentações conduzidas com

concentrações de oxigênio dissolvido em torno de 1,0, 4,0 e 6,0 mg/L, encontram-se nas Figuras 4.38, 4.39 e 4.40, respectivamente.

Para melhor entender a influência da concentração de oxigênio na fermentação, os resultados obtidos com o sistema de controle, mantendo-se diferentes valores de concentração de oxigênio no meio, foram comparados com os valores obtidos em uma fermentação convencional realizada em frasco agitado, considerada como controle. As concentrações de células utilizadas e de produto obtidas estão apresentadas na Tabela 4.22. Os valores de produtividade e rendimento para estas fermentações são apresentados na Tabela 4.23. O experimento com concentração de 4,0 mg/L foi realizado em duplicata e os resultados médios são apresentados.

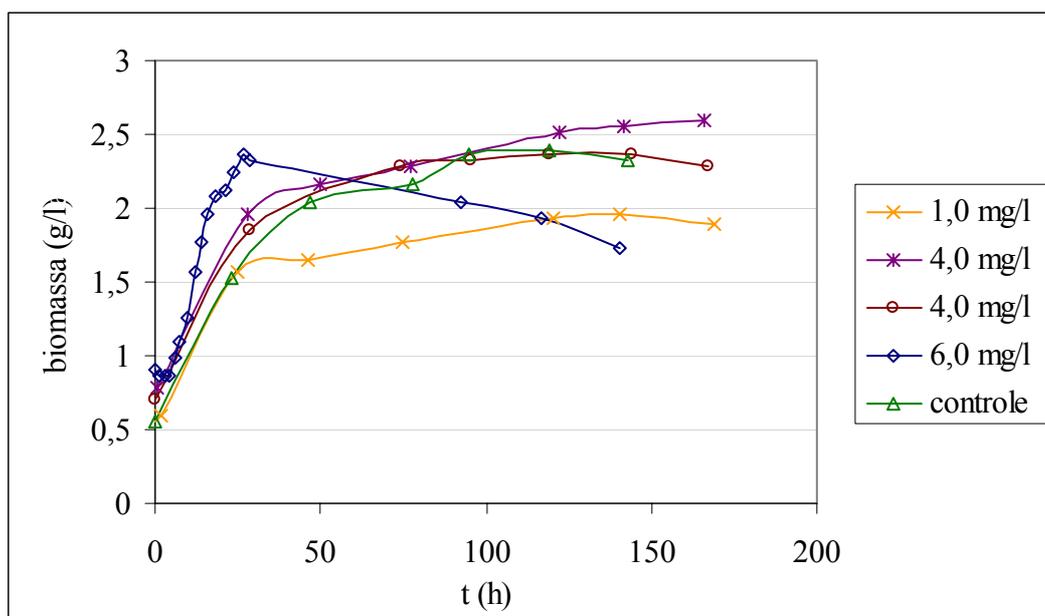


Figura 4.38: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em fermentador – influência da concentração de oxigênio dissolvido no crescimento microbiano.

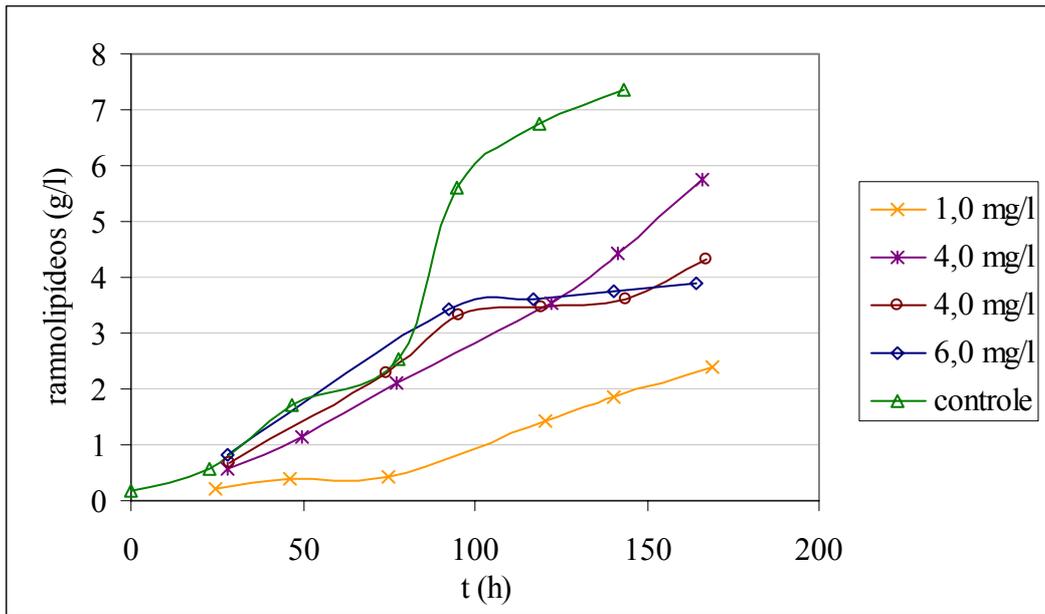


Figura 4.39: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em fermentador – influência da concentração de oxigênio dissolvido na produtividade.

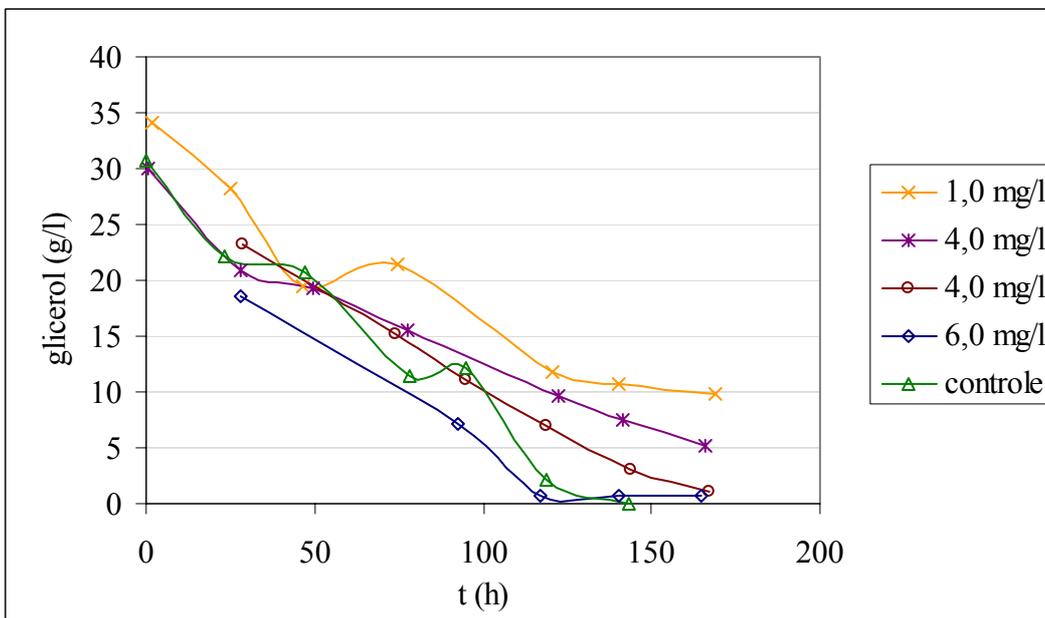


Figura 4.40: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em fermentador – influência da concentração de oxigênio dissolvido no consumo de glicerol.

Tabela 4.22: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – variação da concentração de oxigênio dissolvido (biomassa e concentração de produto).

Oxigênio dissolvido (mg/L)	Biomassa inicial (g/L)	Biomassa com 6 dias (g/L)	Concentração máxima de produto (g/L)
1,0	0,6	2,0	2,4
4,0	0,8	2,5	5,0
6,0	0,9	1,7	4,0
Frasco agitado	0,6	2,3	7,3

Tabela 4.23: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – variação da concentração de oxigênio dissolvido (produtividade e rendimento).

Oxigênio dissolvido (mg/L)	Produtividade (mg/L.h)	Consumo de glicerol (mg/L.h)	$Y_{P/S}$ (g de ramnolipídeos por g de glicerol)
1,0	15,6	133,0	0,12
4,0	29,4	151,5	0,20
6,0	27,6	180,5	0,15
Frasco agitado	51,1	210,5	0,24

Os valores obtidos para o aumento da concentração de biomassa foram similares aos da fermentação convencional em frasco agitado, indicando que as células se mantiveram adaptadas ao sistema de oxigenação. Apenas na fermentação conduzida com concentração de oxigênio dissolvido igual a 6,0 mg/L foi observada uma queda da concentração de células gradativa com o tempo. Este fato já pode estar relacionado com algum tipo de estresse oxidativo, já que também foi observado um consumo de glicerol superior ao obtido nas demais condições, apesar de ALAGAPPAN e COWAN (2004) terem reportado a elevação da taxa específica de crescimento de *Pseudomonas putida* em benzeno e tolueno com o aumento da concentração de oxigênio dissolvido. Porém, estes resultados foram obtidos quando se trabalhava com um volume extremamente inferior ao utilizado no presente trabalho e para as primeiras horas de uma fermentação. Já SABRA *et al.* (2002) afirmam que as bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* exibem uma série de respostas fisiológicas consideráveis ao estresse oxidativo durante crescimento em um biorreator com controle da concentração de oxigênio dissolvido, como a produção de espécies reativas de oxigênio.

Nota-se que a produção de ramnolipídeos é reduzida na fermentação realizada com a menor concentração de oxigênio dissolvido, 1,0 mg/L. Comparativamente à

concentração de 4,0 mg/L observou-se que a menor disponibilidade de oxigênio no meio de cultivo para as células levou a uma menor taxa de crescimento celular, menor consumo de glicerol (1,2 vezes) e menor produção e produtividade em ramnolipídeos (1,8 vezes), indicando que este parâmetro é muito importante na produção desta biomolécula. A produtividade nessa condição é igual a 15,6 mg/L.h e a concentração de ramnolipídeos atinge valor pouco superior a 2,0 g/L após 7 dias de fermentação. Nas demais fermentações realizadas no biorreator com oxigenação por membranas, as produtividades ficam em torno de 30,0 mg/L.h de ramnolipídeos, enquanto que a produtividade em frascos agitados chega a 51,1 mg/L.h, atingindo concentração acima de 8,0 g/L com uma semana de fermentação.

A comparação entre as fermentações conduzidas com e sem o controle automatizado da concentração de oxigênio dissolvido (4,0 mg/L) é apresentada nas Tabelas 4.24 e 4.25.

Tabela 4.24: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – avaliação do controle da concentração de oxigênio dissolvido (biomassa e concentração de produto).

Controle	Biomassa inicial (g/L)	Biomassa com 6 dias (g/L)	Concentração máxima de produto (g/L)
Manual	0,7	1,9	3,8
Automatizado	0,8	2,5	5,0

Tabela 4.25: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – avaliação do controle da concentração de oxigênio dissolvido (produtividade e rendimento).

Controle	Produtividade (mg/L.h)	Consumo de glicerol (mg/L.h)	$Y_{P/S}$ (g de ramnolipídeos por g de glicerol)
Manual	19,6	126,5	0,16
Automatizado	29,4	151,5	0,20

A produtividade obtida para a fermentação com o controle eficiente da concentração de oxigênio dissolvido foi 50 % superior ao observado para as fermentações iniciais, com as mesmas condições. Este resultado indica que a variação extrema e aleatória na concentração de oxigênio dissolvido durante uma fermentação apresenta um efeito prejudicial à produtividade de biossurfactantes em biorreator por *Pseudomonas aeruginosa*. Assim, a implementação do sistema de controle com o uso

do Controlador Lógico Programável foi extremamente benéfica ao presente trabalho, também possibilitando a investigação do consumo de oxigênio da cepa microbiana em estudo. Em termos da concentração final de biossurfactantes, o valor obtido, 5,0 g/L, pode ser comparado aos reportados na literatura para a produção em biorreatores com o processo em batelada simples. BENINCASA *et al.* (2002) reportaram uma concentração de 8,5 g/L, com 1,2 litro de volume útil em um biorreator, enquanto que REILING *et al.* (1986) obtiveram 2,3 g/L, quando trabalhando em um biorreator com 23 litros de volume útil.

Outro aspecto interessante recai sobre a comparação entre a variação inicial no valor da taxa específica de consumo de oxigênio (SOUR) e o aumento na concentração de células. Na Figura 4.41 está apresentada a avaliação entre o crescimento microbiano e a variação na taxa específica de consumo de oxigênio para a fermentação com concentração de oxigênio dissolvido de 4,0 mg/L.

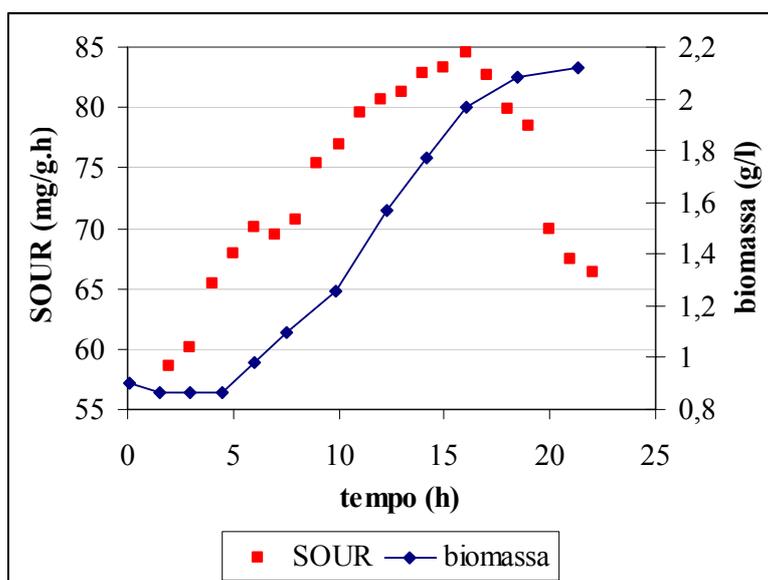


Figura 4.41: Crescimento microbiano (em grama de células por litro) e consumo de oxigênio – SOUR (em miligrama de oxigênio por grama de células por hora) – em função do tempo de fermentação.

No início do experimento, a elevação no valor do consumo se inicia com 4 horas de fermentação e dura cerca de 12 horas, até quando a fermentação atinge 16 horas. É

interessante notar que esse aumento na taxa de consumo coincide com a fase exponencial de crescimento microbiano, como observado na Figura 4.41. Assim, pode-se concluir que o oxigênio é um nutriente essencial para o crescimento microbiano, e que o seu consumo está diretamente relacionado com a fase da fermentação em que as bactérias se encontram, sendo consumido avidamente durante a fase exponencial de crescimento (GOMEZ *et al.*, 2006).

Como citado anteriormente, em todas as fermentações foi observada uma alta taxa de consumo da fonte de nitrogênio, o nitrato de sódio, logo no início dos experimentos. Com o novo sistema de controle de oxigênio em uso, este comportamento também foi observado e está apresentado na Figura 4.42.

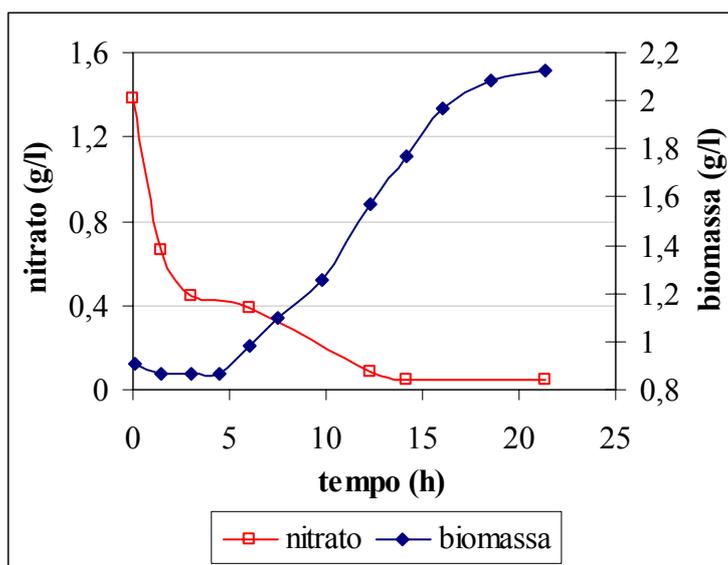


Figura 4.42: Crescimento microbiano e consumo de nitrogênio – Concentração de íons nitrato (em grama por litro) e concentração de biomassa (em grama de células por litro) em função do tempo de fermentação.

Este elevado consumo de nitrato pode ser explicado pelo fato de as células serem preparadas para o início das fermentações em um meio com alta concentração de nitrogênio. Assim, entrando em contato com um meio com concentração baixa deste nutriente, ele é transportado e consumido rapidamente, principalmente na fase de adaptação, onde 70 % deste é absorvido. A produção de ramnolipídeos se dá neste meio

limitado em termos de nitrogênio (SANTOS, 2003, MULLIGAN e GIBBS, 1989, CHA *et al.*, 2007).

Com o sistema de oxigenação com o controle automatizado, também foram conduzidas novas fermentações com adição suplementar de nitrato de sódio em 24 e 48 horas. O perfil cinético de uma fermentação conduzida com a adição suplementar de nitrato está apresentado na Figura 4.43.

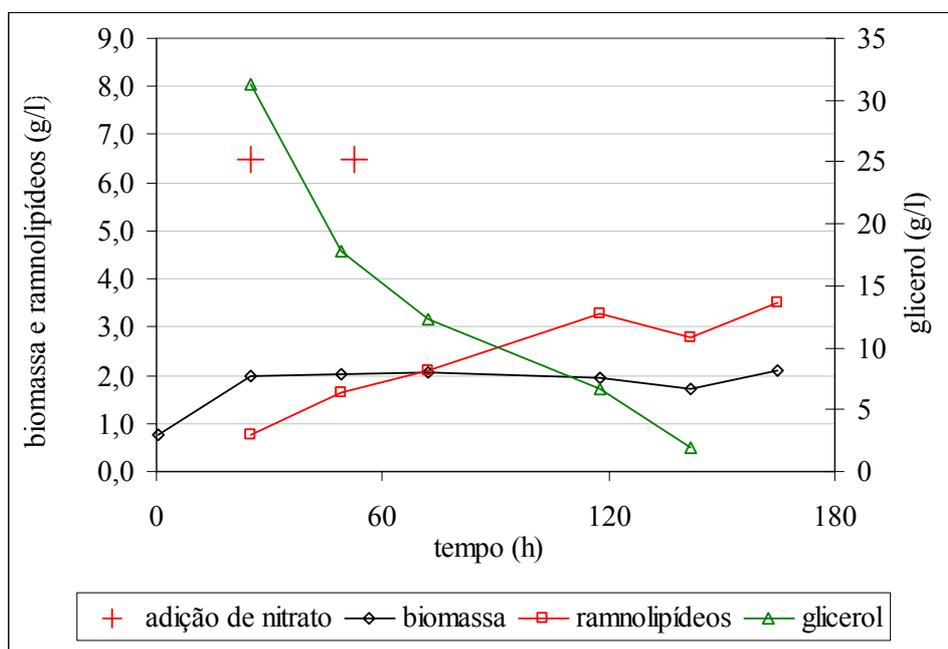


Figura 4.43: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – alimentação suplementar de nitrato de sódio.

O perfil cinético apresentado mostrou-se similar aos obtidos anteriormente. Novamente, não foi observada a extensão da fase de crescimento microbiano ou o aumento na produção de biossurfactantes com a adição extra da fonte de nitrogênio. As fermentações em duplicata foram conduzidas com concentração de oxigênio dissolvido igual a 4,0 mg/L e os resultados médios de crescimento celular, produtividade e rendimento obtidos estão apresentados nas Tabelas 4.26 e 4.27.

Como observado nas fermentações onde o controle da oxigenação ainda era realizado de forma manual, além de não apresentar algum benefício em termos de

produtividade, a alimentação suplementar de nitrato se mostrou ineficiente por reduzir expressivamente o rendimento de substrato em produto, de 0,20 para 0,13, além de provocar um aumento de 45 % no consumo da fonte de carbono. Novamente, este resultado é distinto do observado por TAVARES (2007), que observou que a alimentação suplementar da fonte de nitrogênio eleva a produção de células e de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em biorreator de 0,6 L com oxigênio alimentado por borbulhamento e adição de anti-espumante. Esta diferença de comportamento fisiológico frente à adição da fonte de nitrogênio deve estar relacionado à forma com que o oxigênio é alimentado ao sistema e/ou ao uso do agente anti-espumante.

Tabela 4.26: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – alimentação suplementar de nitrato de sódio (biomassa e concentração de produto). Fermentações com 4,0 mg/L de oxigênio dissolvido.

Alimentação de nitrato (24 e 48 horas)	Biomassa inicial (g/L)	Biomassa com 6 dias (g/L)	Concentração máxima de produto (g/L)
Não	0,8	2,5	5,0
Sim	0,9	2,1	4,0

Tabela 4.27: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – alimentação suplementar de nitrato de sódio (produtividade e rendimento). Fermentações com 4,0 mg/L de oxigênio dissolvido.

Alimentação de nitrato (24 e 48 horas)	Produtividade (mg/L.h)	Consumo de glicerol (mg/L.h)	$Y_{P/S}$ (g de ramnolipídeos por g de glicerol)
Não	29,4	151,5	0,20
Sim	29,3	219,3	0,13

Outro ponto investigado foi o tempo de fermentação. A maior parte das fermentações foi conduzida por apenas 7 dias, tempo suficiente para se avaliar a produtividade de ramnolipídeos em cada condição estudada. Porém alguns testes foram realizados com a condução de experimentos mais longos para se avaliar a viabilidade das células.

Os dois primeiros experimentos a serem conduzidos por mais de 7 dias foram fermentações com a adição suplementar com nitrato em 24 e 48 horas e com a concentração de oxigênio dissolvido mantida em 4,0 mg/L.

A cinética de crescimento microbiano de uma fermentação de longa duração conduzida com a adição de glicerol para repor a fonte de carbono consumida está apresentada na Figura 4.44.

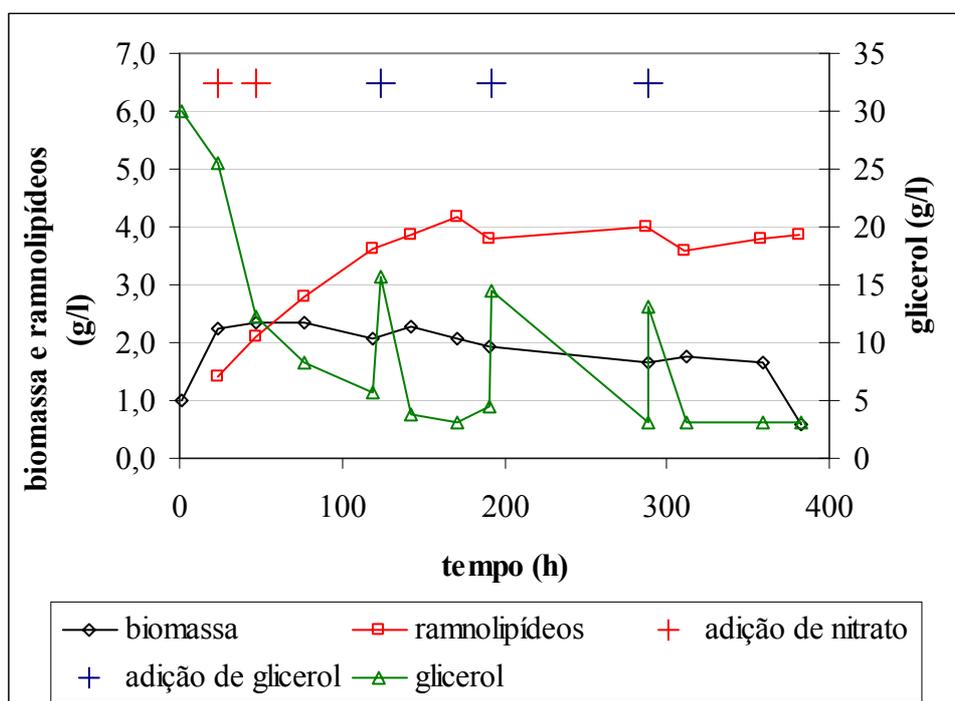


Figura 4.44: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – fermentação de longa duração com alimentação suplementar de nitrato de sódio e adição extra de glicerol.

Na primeira fermentação de longa duração a ser investigada, foi observado que a concentração da fonte de carbono, o glicerol, inicialmente igual a 30,0 g/L, atingiu valor próximo a 5,0 g/L com apenas 5 dias de fermentação. Assim, para que se evitasse o fim da fonte de carbono, que poderia resultar no encerramento da produção de ramnolipídeos ou até no consumo do biossurfactante já produzido, foi realizada a adição extra de glicerol, de tal modo que sua concentração se elevasse em 10,0 g/L. Mais duas adições de glicerol foram realizadas até o fim da fermentação para se evitar o

esgotamento dessa fonte de carbono. Como pode ser observado na Figura 4.44, a produção de ramnolipídeos não seguiu além dos 7 dias (168 horas). Porém, o biossurfactante não foi consumido, já que havia outra fonte de carbono de mais fácil assimilação disponível. Após 15 dias, foi observada a morte celular e a fermentação foi encerrada.

A produção de ramnolipídeos se dá em condições onde o acesso à fonte de nitrogênio é limitado (BENINCASA, 2002). Contudo, esse nutriente é essencial para a manutenção da viabilidade celular. Assim, uma nova fermentação de longa duração seguinte foi conduzida com a adição de uma solução contendo não apenas glicerol, mas também nitrato de sódio. Essa solução de alimentação apresentava a mesma relação carbono/nitrogênio do meio de fermentação inicial. A cinética de crescimento microbiano, a produção de biossurfactante e o consumo da fonte de carbono desta fermentação estão apresentados na Figura 4.45.

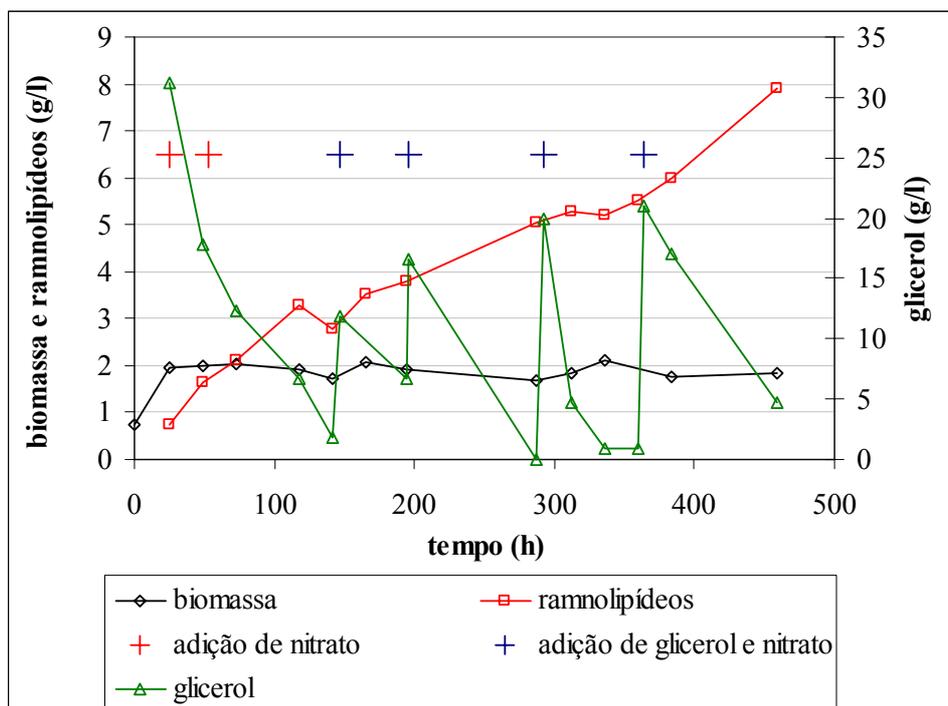


Figura 4.45: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – fermentação de longa duração com alimentação suplementar de nitrato de sódio e adição extra de glicerol e nitrato de sódio.

Neste novo experimento, foi possível a manutenção da produção de ramnolipídeos por até 19 dias (460 horas), chegando a uma concentração igual a 7,9 g/L, com produtividade igual a 17,2 mg/L.h. Este resultado mostra que a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 pode ser conduzida em fermentadores com o auxílio da oxigenação por membranas por um longo período, com o modo de condução estabelecido como uma batelada alimentada. Porém, BENINCASA *et al.* (2002) obtiveram um valor de 15,9 g/L de ramnolipídeos quando conduzindo um processo em biorreator com alimentação extra das fontes de carbono e nitrogênio. A taxa específica de consumo de oxigênio durante esta fermentação está apresentada na Figura 4.46.

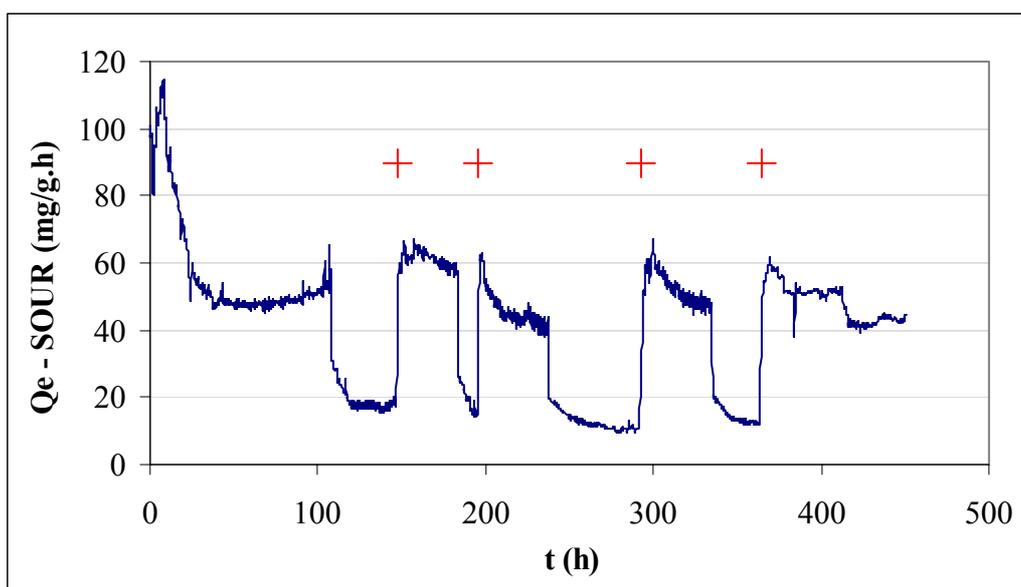


Figura 4.46: Taxa específica de consumo de oxigênio (SOUR – *Specific Oxygen Uptake Rate*), expressa em miligrama de oxigênio por grama de células por hora, ao longo de uma fermentação de longa duração para a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*. Os pontos em cruz marcam as adições de carbono e nitrogênio.

Pode-se observar que ocorre uma alteração imediata no consumo de oxigênio a cada adição da solução de glicerol e nitrato de sódio, com o valor da taxa se elevando para cerca de 60,0 mg/g.h. Pouco tempo depois de cada adição, a taxa de consumo retorna a valores próximos a 20,0 mg/g.h, valor atingido no fim das fermentações conduzidas em batelada simples. Essa alteração no consumo de oxigênio está

relacionada com uma mudança no metabolismo celular com maior utilização de oxigênio pelas células devido à maior disponibilidade de nitrogênio no meio de cultivo.

Contudo, deve-se ressaltar que essa mesma fermentação apresentava produtividade igual a 28,1 mg/L.h com 5 dias de experimento e que a adição suplementar de nitrogênio com 24 e 48 horas leva a um grande consumo da fonte de carbono. Assim, foi conduzida uma fermentação sem a alimentação da fonte de nitrogênio no início da fermentação e com a alimentação da solução contendo glicerol e nitrato sempre que a concentração da fonte de carbono atingisse valores próximos a 5,0 g/L. Os resultados dessa fermentação estão apresentados na Figura 4.47.

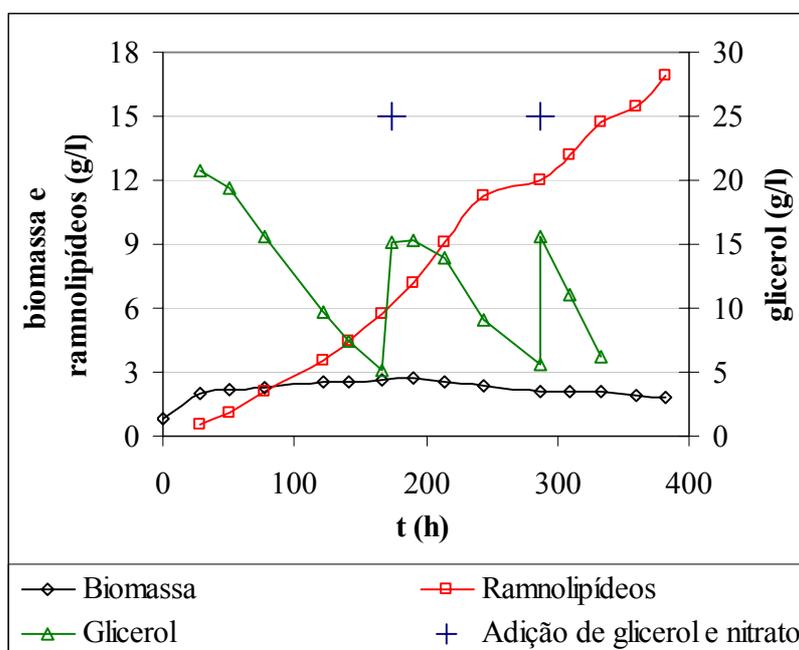


Figura 4.47: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – fermentação de longa duração com adição extra de glicerol e nitrato de sódio.

Esse novo experimento foi conduzido por 16 dias e foi possível se atingir uma concentração final de ramnolipídeos igual a 16,9 g/L, superior a obtida por BENINCASA *et al.* (2002). A produtividade passou de 28,7 mg/L.h em 5 dias de fermentação no experimento anterior (Figura 4.45) para 44,3 mg/L.h (Figura 4.47). Nesta última fermentação, a produtividade inicial, calculada com 7 dias, apresentou valor em torno de 30 mg/L.h, similar aos obtidos anteriormente. Mas, com o decorrer da

fermentação e com as adições extras de carbono e nitrogênio, esse valor se elevou para 49,0 mg/L.h, entre o sétimo dia e o fim do experimento. Isto pode ocorrer pelo fato das células já estarem mais adaptadas ao meio de fermentação neste ponto – das adições – do que no início do experimento.

A comparação entre as fermentações de longa duração com e sem a adição de nitrato com 24 e 48 horas de fermentação está apresentada nas Tabelas 4.28 e 4.29.

Tabela 4.28: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em fermentações de longa duração – com e sem adição suplementar de nitrato (biomassa e concentração de produto).

Alimentação de nitrato (24 e 48 horas)	Biomassa inicial (g/L)	Biomassa – conc. máxima (g/L)	Concentração máxima de produto (g/L)
Sim	0,8	2,1	7,9
Não	0,8	2,7	16,9

Tabela 4.29: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em fermentações de longa duração – com e sem adição suplementar de nitrato (produtividade e rendimento).

Alimentação de nitrato (24 e 48 horas)	Produtividade (mg/L.h)	Consumo de glicerol (mg/L.h)	$Y_{P/S}$ (g de ramnolipídeos por g de glicerol)
Sim	17,2	185,6	0,09
Não	44,3	131,3	0,34

Pode-se observar que, também em relação ao rendimento da conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), a fermentação sem a adição de nitrato se iguala às fermentações anteriores realizadas em frascos agitados. Também nota-se que, mesmo com um resultado inferior, o rendimento da fermentação de longa duração com a alimentação de suplementar de nitrato se compara aos resultados das fermentações com as mesmas condições e uma duração menor.

Assim, pode-se afirmar que o processo conduzido no biorreator com oxigenação por membranas atingiu valores de produtividade próximos aos valores obtidos em frascos agitados, atingindo concentração de até 16,9 g/L de ramnolipídeos, com

rendimento de substrato em produto de 0,34. Ainda, como já mencionado anteriormente, afirma-se que o novo sistema, proposto para viabilizar o aumento de escala da produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*, pode ser utilizado continuamente por tempo superior a duas semanas, garantindo uma redução nos custos de processamento, devido à eliminação de algumas etapas do preparo do inoculo, se comparado a processos com menor duração.

Os melhores resultados de produtividade de ramnolipídeos obtidos recentemente pelo nosso grupo de trabalho estão apresentados na Tabela 4.30. Comparando os resultados apresentados no presente trabalho com os demais obtidos pelo mesmo grupo de pesquisa, utilizando a cepa PA1 de *Pseudomonas aeruginosa* na produção de ramnolipídeos a partir de glicerol, observa-se um crescente aumento na concentração final de ramnolipídeos e em sua produtividade volumétrica. A concentração final de ramnolipídeos obtida no presente trabalho foi a maior atingida por todo o grupo e o valor de produtividade está entre os maiores quando a fermentação é conduzida sem a adição de agentes anti-espumantes. Além disso, o volume total de meio de fermentação utilizado neste trabalho foi superior aos demais, resultando na produção de 132,9 miligramas de ramnolipídeos por hora de fermentação.

Tabela 4.30: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 a partir de glicerol: resultados recentes deste grupo de pesquisa.

Referência	Ramnolipídeos (g/L)	Produtividade (mg/L.h)	Volume (L)	Produção (mg/h)
SANTA ANNA, 2000	2,6	19,0	0,4	7,6
SANTA ANNA <i>et al.</i> , 2002	7,0	41,9	0,4	16,8
SANTOS, 2003	9,0	47,0	0,1	4,7
TAVARES, 2007	7,4	77,1	0,6	46,3
Presente trabalho	16,9	44,3	3,0	132,9

4.4.4. Testes de Fermentações em Seqüência

Também visando o maior entendimento do comportamento celular, foram realizados alguns testes em frascos agitados contemplando fermentações em seqüência. Estas fermentações foram iniciadas com as células provenientes de uma fermentação

anterior, conduzida em batelada simples, ao invés de se utilizar o procedimento tradicional de preparo do inóculo. A fermentação “a” foi realizada com o uso do inóculo convencional. A fermentação “b”, com o inóculo de células do final da fermentação “a”, após 9 dias, e a fermentação “c”, com o inóculo de células do final da fermentação “b”, que durou 10 dias. Os resultados obtidos para essas fermentações estão apresentados nas Figuras 4.48, 4.49 e 4.50, e nas Tabelas 4.31 e 4.32.

Os valores de produtividade e rendimento obtidos nestes experimentos foram inferiores aos obtidos anteriormente. Isto pode ter ocorrido devido a alguma alteração na cepa bacteriana utilizada nestes experimentos. Mesmo assim, pode ser observado que, tanto em termos de produtividade quanto de rendimento, as fermentações conduzidas com células provenientes do final de outros experimentos apresentaram resultados próximos aos obtidos com a fermentação com o inóculo convencional. Como reportado por SANTOS (2003), a recuperação e reutilização da biomassa proveniente do final de uma fermentação não representou perda da capacidade de crescimento celular e de produção de biossurfactante. Assim, além de ser viável a condução de fermentações de longa duração, as células provenientes destas fermentações podem ser utilizadas para o início de outros experimentos, não sendo necessária a etapa do preparo do inóculo ao início de cada fermentação. Esta estratégia, além de conduzir a um aumento global da produtividade através da redução do tempo de preparo do inóculo, ainda pode facilitar a condução da etapa de pré-inóculo em processos conduzidos em maiores escalas.

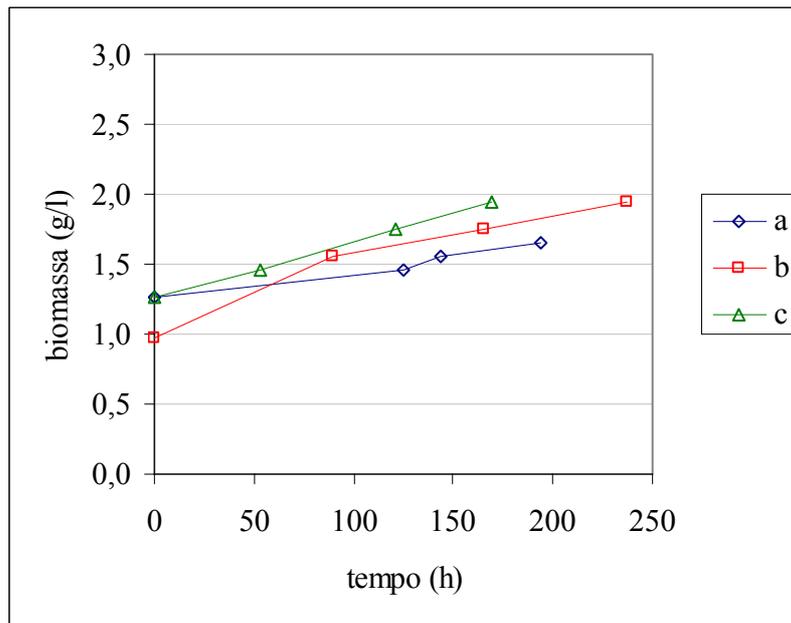


Figura 4.48: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – crescimento celular nas fermentações em seqüência realizadas em frascos agitados.

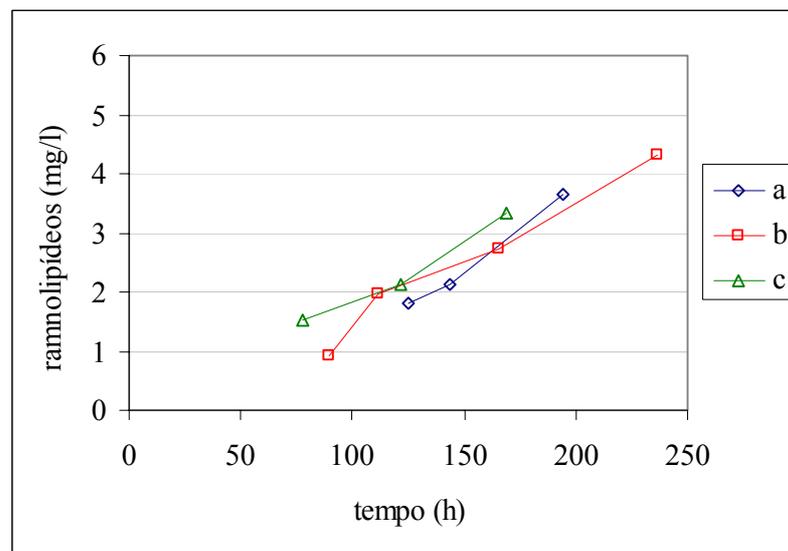


Figura 4.49: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – produtividade nas fermentações em seqüência realizadas em frascos agitados.

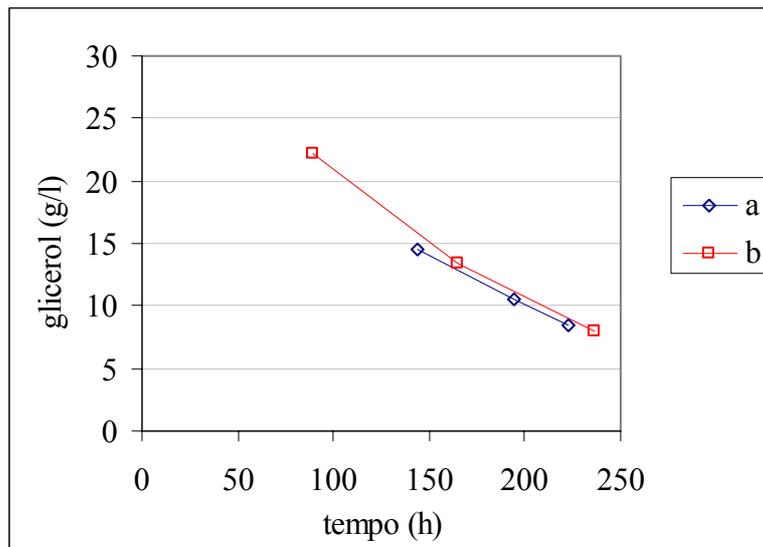


Figura 4.50: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* – consumo de glicerol nas fermentações em seqüência realizadas em frascos agitados.

Tabela 4.31: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em frascos agitados – fermentações em seqüência (biomassa e concentração de produto).

Fermentação	Biomassa inicial (g/L)	Biomassa – conc. máxima (g/L)	Concentração máxima de produto (g/L)
a	1,2	1,7	3,6
b	1,0	2,0	4,3
c	1,2	2,0	3,3

Tabela 4.32: Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em frascos agitados – fermentações em seqüência (produtividade e rendimento).

Fermentação	Produtividade (mg/L.h)	Consumo de glicerol (mg/L.h)	$Y_{P/S}$ (g de ramnolipídeos por g de glicerol)
a	18,8	75,5	0,25
b	22,6	82,7	0,27
c	19,7	-	-

5. Conclusões e Sugestões

A seguir, são apresentadas as principais conclusões do presente trabalho e algumas sugestões para a sua continuidade.

Modelagem e Simulação do Oxigenador

O uso de contactores com fibras-ocas microporosas cobertas com uma fina camada superficial (pele) de material denso com grande afinidade pelo oxigênio, neste caso o silicone, leva a uma maior capacidade de transferência de gás, se comparado ao uso de fibras microporosas simples. Mesmo com a resistência extra à transferência pela presença da camada densa, a absorção se dá por toda a extensão da fibra, diferente do caso da membrana simples, onde a área interfacial se resume à área de poros.

A dependência do valor da área de membrana com a vazão por fibra (velocidade de escoamento, número de Reynolds) também deve ser ressaltada. Para baixos valores de vazão, observa-se que o seu aumento leva à diminuição da área, o que pode ser explicado pelo favorecimento da transferência de massa pelo aumento da força motriz do processo, o gradiente de concentração. Mas, com o contínuo aumento dessa vazão, o valor da área volta a aumentar. Este fato ocorre devido à diminuição no tempo de residência do líquido nas fibras, que passa a não ser mais suficiente para atender determinada taxa de transferência requerida.

Para a maior parte das condições estudadas, com o uso de fibras-ocas compostas, foi possível se obter valores de área inferiores a 1,0 metro quadrado, ajustando-se as condições operacionais. Com a correta escolha da pressão de operação da corrente gasosa e de sua composição, ar ou oxigênio puro, além da definição da vazão da corrente líquida, pode-se escolher um contactor com valor de área relativamente baixo para o uso como oxigenador em um processo fermentativo.

Estimação de parâmetros na oxigenação

Os erros experimentais foram os fatores principais para a dificuldade de ajuste de alguma função aos valores obtidos para o coeficiente volumétrico de transferência de massa. Mesmo com essa dificuldade, o modelo final utilizado e seus parâmetros podem descrever o sistema em estudo com alguma propriedade. Foi observado que a transferência de oxigênio é fortemente influenciada pela vazão da corrente líquida, tendo seu aumento uma atuação positiva frente à oxigenação.

Outra variável que demonstrou influência positiva sobre a quantidade total de oxigênio transferida foi a pressão parcial de oxigênio na corrente gasosa, como esperado, já que há o aumento do gradiente de concentração na fase líquida (aumento na concentração de equilíbrio) e este é a força motriz do processo.

Testes de oxigenação

Contactores de fibras microporosas podem ser usados para a oxigenação de correntes aquosas com valores de tensão superficial próximos ao da água pura. Quando utilizadas correntes com baixos valores de tensão superficial (28,4 mN/m), a interface não fica imobilizada na entrada dos poros – ocorre a passagem de líquido quando a pressão desta fase é superior a da fase gasosa. Para a oxigenação destas correntes, deve-se utilizar membranas compostas.

Os coeficientes de transferência de massa obtidos para as membranas compostas são equivalentes aos obtidos para as membranas microporosas simples.

A oxigenação com o escoamento de líquido pelo lado externo das fibras leva a maiores valores dos coeficientes de transferência de massa. Entretanto, esta opção não pode ser considerada para a oxigenação de meios de cultivo quando usadas as fibras compostas com a camada superficial densa interna, devido a grande concentração de proteínas e demais produtos do metabolismo celular que ficam aderidos aos poros superficiais da membrana, reduzindo sua área útil.

Foi observada a redução da capacidade de oxigenação dos módulos com fibras compostas com o passar do tempo. Esta redução está relacionada à condensação capilar de água no interior dos poros (água que se difunde da fase líquida para a gasosa e condensa no interior dos poros), já discutida anteriormente. Para se contornar este problema, recorre-se à utilização de fibras densas, que apresentam desempenho inalterado após a condução de diversos testes.

Fermentações

Foi comprovado que o oxigênio é extremamente importante para o crescimento celular e para a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em um biorreator. Além disso, o escoamento do meio de cultivo contendo as células por uma bomba de engrenagens não afetou o crescimento celular ou a produtividade. Assim, contornando o problema da formação excessiva de espuma, o sistema de oxigenação através de um contactor de membranas externo ao biorreator se faz viável e necessário.

O sistema de oxigenação com controle manual da concentração de oxigênio dissolvido mostrou-se impreciso, permitindo uma grande variação deste parâmetro durante as fermentações. Mesmo assim, foi possível a obtenção de valores de produtividade de ramnolipídeos em torno de 20 mg/L.h, com consumo de glicerol próximo a 100 mg/L.h e rendimento de substrato em produto de 0,20. A produtividade obtida é cerca de 50 % inferior àquela obtida em fermentações em frascos agitados, porém estes resultados já indicam a possibilidade do uso deste sistema de oxigenação na produção de ramnolipídeos em maior escala.

O controle automatizado da concentração de oxigênio dissolvido solucionou o problema de sua grande variação ao longo de uma fermentação e ainda possibilitou a obtenção dos valores de consumo de oxigênio das bactérias. Foi interessante notar a variação da taxa específica de consumo de oxigênio ao longo do tempo, tendo seu valor elevado durante a fase exponencial do crescimento celular, atingindo até 100 miligramas de oxigênio por grama de célula por hora. Outro ponto foi a estabilização

deste valor em torno de 20 mg/g.h, quando na fase estacionária de crescimento, onde a produção de ramnolipídeos é máxima. Estes valores para o consumo de oxigênio não apresentaram variações significativas com a alteração dos parâmetros investigados.

Foi possível determinar que a concentração de oxigênio dissolvido ideal para a produção de ramnolipídeos pela cepa bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* PA1 é igual a 4,0 mg/L. Nesta situação, foi obtida uma produtividade volumétrica igual a 30 mg/L.h e um consumo de glicerol de 150 mg/L.h. Esta produtividade é 50 % superior a obtida sem o controle da concentração de oxigênio dissolvido, mantendo-se o mesmo rendimento de substrato em produto, de 0,20. Concentrações inferiores a 4,0 mg/L de oxigênio dissolvido dificultam o acesso a esse nutriente e superiores causam estresse oxidativo nas células.

Contrariamente ao reportado anteriormente na literatura, a adição suplementar da fonte de nitrogênio nas primeiras horas de fermentação não elevou a concentração celular e, conseqüentemente, não apresentou efeito sobre a produção de ramnolipídeos. Com o sistema em estudo, foi ainda observado um aumento no consumo da fonte de carbono, reduzindo o rendimento da fermentação.

Para a condução de experimentos de longa duração, fez-se necessária a adição extra da fonte de carbono, que era esgotada. Mas a produção do biossurfactante somente foi mantida quando, junto à fonte de carbono, foi adicionada também a fonte de nitrogênio utilizada no meio inicial de modo a se manter a mesma relação carbono/nitrogênio. Assim, foi possível se obter uma concentração de ramnolipídeos de 16,9 g/L após 16 dias de fermentação, correspondendo a uma produtividade de 44,3 mg/L.h, com rendimento de substrato em produto de 0,34 e produção de 132,9 miligramas de ramnolipídeos por hora.

Sugestões para trabalhos futuros

O processo proposto é uma boa alternativa para a produção de ramnolipídeos, favorecendo o controle e o aumento de escala de produção. A partir deste ponto, novos

testes devem ser realizados contemplando a otimização da composição do meio de fermentação para as novas condições de trabalho. Também se deve investigar o reciclo de células para o fermentador e a retirada contínua do produto, que podem resultar na operação em condições de alta densidade celular e conseqüente aumento na produtividade do sistema. Por fim, recomenda-se também investigar a implementação de um sistema de oxigenação por membranas acoplado a outro, de microfiltração, para a retenção de células. A transferência de oxigênio seria realizada apenas para a corrente livre de células, que também retornaria ao biorreator. Assim, poderia se evitar o estresse oxidativo, que pode ocorrer devido a passagem de todas as bactérias pelo oxigenador, que entram em contato pontualmente com elevadas concentrações de oxigênio.

6. Referências Bibliográficas

- ACS COMMITTEE ON ANALYTICAL REAGENTS, 2006, *Colorimetry and Turbidimetry. Reagent Chemicals: Specifications and Procedures*. American Chemical Society - Oxford University Press, 10 ed., pp. 32-41.
- AHMED, T., SEMMENS, M. J., 1996, "Use of transverse flow hollow fibers for bubbleless membrane aeration", *Wat. Res.* v. 30, n. 2, pp. 440-446.
- ALAGAPPAN, G., COWAN, R. M., 2004, "Effect of temperature and dissolved oxygen on the growth kinetics of *Pseudomonas putida* F1 growing on benzene and toluene", *Chemosphere* 54, pp. 1255-1265.
- BAI, G., BRUSSEAU, M. L., MILLER, R. M., 1997, "Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil", *Journal of Contaminant Hydrology* 25, pp. 157-170.
- BANAT, I. M., 1995, "Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review", *Bioresource Technology* 51, pp. 1-12.
- BANAT, I. M., MAKKAR, R. S., CAMEOTRA, S. S., 2000, "Potential commercial applications of microbial surfactants", *Appl Microbiol Biotechnol* 53, pp. 495-508.
- BENINCASA, M., CONTIERO, J., MANRESA, M. A. *et al.*, 2002, "Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source", *Journal of Food Engineering* 54, pp. 283-288.
- BEYENAL, H., CHEN, S. N., LEWANDOWSKI, Z., 2003, "The double substrate growth kinetics of *Pseudomonas aeruginosa*", *Enzyme and Microbial Technology* 32, pp. 92-98.

- BLANCH, H. W., CLARK, S. C., 1997, *Biochemical Engineering*. Marcel Dekker, Inc.
- CAMPOS-GARCÍA, J., CARO, A. D., NÁJERA, R. *et al.*, 1998, “The *Pseudomonas aeruginosa rhlG* gene encodes an NADPH-dependent β -ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis”, *Journal of Bacteriology* v. 180, n, 17, pp. 4442-4451.
- CHA, M., LEE, N., KIM, M. *et al.*, 2007, “Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*”, *Bioresour. Technol.* doi:10.1016/j.biortech.2007.05.035.
- COSTA, S. G. V. A. O., NITSCHKE, M., HADDAD, R. *et al.*, 2006, “Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils”, *Process Biochemistry* 41, pp. 483-488.
- CUTAYAR, J., POILLON, D., CUTAYAR, S., 1990, “Process for the controlled oxygenation of an alcoholic fermentation must or wort”, US Pat. 4,978,545, EUA.
- DESAI, J. D., BANAT, I. M., 1997, “Microbial production of surfactants and their commercial potential”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* v. 61, n. 1, pp. 47-64.
- DI LUCCIO, M., 2001, *Produção de etanol e frutose em biorreator integrado a processos com membranas*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- ECOAGÊNCIA SOLIDÁRIA DE NOTÍCIAS AMBIENTAIS, 2005. In: <http://www.ecoagencia.com.br/index.php?option=content&task=view&id=544&Itemid=2>.
- ECO-CHEM ORGANICS CO. In: <http://www.ecochem.com>.

- FERRAZ, H. C., ALVES, T. L. M., BORGES, C. P., 2001, "Coupling of an electro dialysis unit to a hollow fiber bioreactor for separation of gluconic acid from sorbitol produced by *Zymomonas mobilis* permeabilized cells", *Journal of Membrane Science* 191, pp. 43-51.
- FIECHTER, A., 1992, "Biosurfactants: moving towards industrial application", *Trends in Biotechnology* 10, pp. 208-217.
- FUTSELAAR, H., 1996, *A techno-economical evaluation of potential applications of pervaporation – influence of module design*, Research and development project final report, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- GABELMAN, A., HWANG, S., 1999, "Hollow Fiber Membrane Contactors", *Journal of Membrane Science* 159, pp. 61-106.
- GALVIN, K. P., 2005, "A conceptually simple derivation of the Kelvin equation", *Chemical Engineering Science* 60, pp. 4659-4660.
- GOMEZ, E., SANTOS, V. E., ALCON, A. *et al.*, 2006, "Oxygen-Uptake and Mass-Transfer Rates on the Growth of *Pseudomonas putida* CECT5279: Influence on Biodesulfurization (BDS) Capability", *Energy & Fuels* 20, pp. 1565-1571.
- GRUBER, T., CHMIEL, H., KAPPELI, O. *et al.*, 1993, "Integrated process for continuous rhamnolipid biosynthesis". In: Kosaric, N. (ed), *Biosurfactants (Surfactants Science Series)* 48, chapter 5, pp. 157-173.
- GUERRA-SANTOS, L., KAPPELI, O., FIECHTER, A., 1984, "*Pseudomonas aeruginosa* Biosurfactant Production in Continuous Culture with Glucose as Carbon Source", *Applied and Environmental Microbiology* v. 48, n. 2, pp. 301-305.

- GUO-LIANG, Z., YUE-TING, W., XIN-PING, Q. et al., 2005, "Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids". *Journal of Zhejiang University Science* 6B(8), pp. 725-730.
- HABA, E., ESPUNY, M. J., BUSQUETS, M. et al., 2000, "Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils", *Journal of Applied Microbiology* 88, pp. 379-387.
- HELVACI, S. S., PEKER, S., ÖZDEMİR, G., 2004, "Effect of electrolytes on the surface behavior of rhamnolipids R1 and R2", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 35, pp. 225-233.
- HINES, A. L., MADDOX, R. N., 1985, *Mass Transfer – Fundamentals and Applications*. Prentice-Hall, Inc.
- JARVIS, F. G., JOHNSON, M. J., 1949, "A glyco-lipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*", *J. Am. Chem. Soc.* 71, pp. 4121-4126.
- JENEIL BIOSURFACTANT COMPANY. In: <http://www.biosurfactant.com>.
- JEONG, H., LIM, D., HWANG, S. et al., 2004, "Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* immobilised in polyvinyl alcohol beads", *Biotechnology Letters* 26, pp. 35-39.
- JUWARKAR, A. A., NAIR A., DUBEY, K. V., 2007, "Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils". *Chemosphere* 68, pp. 1996-2002.
- KEMPERMAN, A. J. B., 1995, *Stabilization of supported liquid membranes*. Ph. D. Thesis, University of Twente, The Netherlands.

- KIM, Y., YANG, S., 2000, "Absorption of carbon dioxide through hollow fiber membranes using various aqueous absorbents", *Separation and Purification Technology* 21, pp. 101-109.
- KLAASSEN, R., FERON, P. H. M., VAN DER VAART, R *et al.*, 2003, "Industrial applications and opportunities for membrane contactors". In: Bhattacharyya, D. and Butterfield, D. A. (eds), *New Insights into Membrane Science and Technology: Polymeric and Biofunctional Membranes*, v.8, chapter 6, Elsevier Science B.V.
- KOVVALI, A. S., SIRKAR, K. K., 2003, "Membrane contactors: recent developments". In: Bhattacharyya, D. and Butterfield, D. A. (eds), *New Insights into Membrane Science and Technology: Polymeric and Biofunctional Membranes*, v.8, chapter 7, Elsevier Science B.V.
- KREULEN, H., SMOLDERS, C. A., VERSTEEG, G. F. *et al.*, 1993, "Microporous hollow fibre membrane modules as gas-liquid contactors. Part 1 - Physical mass transfer processes", *Journal of Membrane Science* 78, pp. 197-216.
- MA, F., HANNA, M. A., 1999, "Biodiesel production: a review", *Bioresource Technology* 70, pp. 1-15.
- MILLER R. M., 1995, "Biosurfactant-facilitated Remediation of Metal-contaminated Soils", *Environmental Health Perspectives* 103 (Suppl 1), pp. 59-62.
- MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2005, *Notícias/Petróleo, Gás Natural e Combustíveis Renováveis*. In: <http://www.mme.gov>.
- MULDER, M.H.V., 1991, *Basic Principles of Membrane Technology*. Holanda, Kluwer Acad. Pub.
- MULLIGAN, C. N., EFTEKHARI, F., 2003, "Remediation with surfactant foam of PCP-contaminated soil", *Engineering Geology* 70, pp. 269-279.

- MULLIGAN, C. N., GIBBS, B. F., 1989, "Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*", *Applied and Environmental Microbiology* v. 55, n. 11, pp. 3016-3019.
- MULLIGAN, C. N., MAHMOURIDES, G., GIBBS, B. F., 1989, "The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*", *Journal of Biotechnology* 12, pp. 199-210.
- MULLIGAN, C. N., YONG, R. N., GIBBS, B. F., 2001, "Heavy metal removal from sediments by biosurfactants", *Journal of Hazardous Materials* 85, pp. 111-125.
- NII, S., TAKEUSHI, H., 1994, "Removal of CO, and/or SO, from gas streams by a membrane absorption method", *Gas Separation & Purification* v. 8, n. 2, pp. 107-114.
- NOORDMAN, W. H., WACHTER, J. H. J., DE BOER, G. J. *et al.*, 2002, "The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability", *Journal of Biotechnology* 94, pp. 195-212.
- PARKINSON, M., 1985, "Bio-surfactants", *Biotech. Adv.* 3, pp. 65-83.
- PENDRAGON HOLDINGS LTD. In: <http://www.pd-5england.co.uk/index.htm>.
- PERRY, R. H., CHILTON, C. H., 1973, *Chemical Engineers' Handbook*. 5 ed., McGraw-Hill Kogakusha Ltd.
- PHAM, T. H., WEBB, J. S., REHM, B. H. A., 2004, "The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation", *Microbiology* 150, pp. 3405-3413.

- QI, Z., CUSSLER, E. L., 1985a, "Microporous hollow fibers for gas absorption. I - Mass transfer in the liquid", *Journal of Membrane Science* 23, pp. 321-332.
- QI, Z., CUSSLER, E. L., 1985b, "Microporous hollow fibers for gas absorption. II - Mass transfer across the membrane", *Journal of Membrane Science* 23, pp. 333-345.
- RAHMAN, K. S. M., BANAT, I. M., THAHIRA, J. *et al.*, 2002a, "Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterium consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant", *Bioresource Technology* 81, pp. 25-32.
- RAHMAN, K. S. M., RAHMAN, T. J., KOURKOUTAS, Y. *et al.*, 2003, "Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients", *Bioresource Technology* 90, pp. 159-168.
- RAHMAN, K. S. M., RAHMAN, T. J., MCCLEAN, S. *et al.*, 2002b, "Rhamnolipid Biosurfactant Production by Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Using Low-Cost Raw Materials", *Biotechnol. Prog.* 18, pp. 1277-1281.
- RAZA, Z. A., KHAN, M. S., KHALID, Z. M., 2007, "Evaluation of distant carbon sources in biosurfactant production by a gamma ray-induced *Pseudomonas putida* mutant", *Process Biochemistry* 42, pp. 686-692.
- REILING, H. E., THANEI-WYSS, U., GUERRA-SANTOS, L. H. *et al.*, 1986, "Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*", *Applied and Environmental Microbiology* v. 51, n. 5, pp. 985-989.
- SABRA, W., KIM, E., ZENG, A., 2002, "Physiological responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic and aerobic cultures", *Microbiology* 148, pp. 3195-3202.

- SABRA, W., ZENG, A. P., LUNSDORF, H. *et al.*, 2000, “Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase”, *Applied and Environmental Microbiology* v.66, n. 9, pp. 4037-4044.
- SANTA ANNA, L. M. M., 2000, *Produção de biossurfactante do tipo ramnolipídeo por Pseudomonas sp.* Dissertação de M.Sc., Faculdade de Farmácia/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SANTA ANNA, L. M. M., 2005, *Produção e utilização de biossurfactantes na biorremediação de solos impactados com petróleo.* Tese de D.Sc., Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SANTA ANNA, L. M. M., FREIRE, D. M. G., KRONEMBERGER, F. A. *et al.*, 2004, “Biossurfactante e uso do mesmo em remediação de solos impactados por óleo”, Patente PI 0405952-2, Brasil.
- SANTA ANNA, L. M. M., SEBASTIAN, G. V., MENEZES, E. P. *et al.*, 2002., “Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments”, *Brazilian Journal of Chemical Engineering* v. 19, n. 2, pp. 159-166.
- SANTA ANNA, L. M. M., SORIANO, A. U., GOMES, A. C. *et al.*, 2007., “Use of biosurfactant in the removal of oil from contaminated sandy soil”, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* v. 82, n. 7, pp. 687-691.
- SANTOS, A. S., 2003, *Produção de ramnolipídeos por Pseudomonas aeruginosa.* Tese de D.Sc., Instituto de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SANTOS, A. S., SAMPAIO, A. W., VASQUEZ, G. S. *et al.*, 2002, “Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of

Pseudomonas aeruginosa”, *Applied Biochemistry and Biotechnology* v. 100, n. 1-3, pp. 1025-1036.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G., AGUIRRE-RAMÍREZ, M., SÁNCHEZ, R., 2005a, “The *Pseudomonas aeruginosa* RhIA enzyme is involved in rhamnolipid and polyhydroxyalkanoate production”, *J Ind Microbiol Biotechnol* 32, pp. 675-677.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G., LÉPINE, F., DÉZIEL, E., 2005b, “Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*”. *Appl Microbiol Biotechnol* 68, pp. 718-725.

STIPCEVIC, T., PILJAC, A., PILJAC, G., 2006, “Enhanced healing of full-thickness burn wounds using di-rhamnolipid”, *Burns* 32, pp. 24-34.

TAI, M. S. L., CHUA, I., LI, K. *et al.*, 1994, “Removal of dissolved oxygen in ultrapure water production using microporous membrane modules”, *Journal of Membrane Science* 87, pp. 99-105.

TAVARES, L. F., 2007, *Estudo cinético da produção de biosurfactantes do tipo ramnolipideos por Pseudomonas aeruginosa PA1*. Dissertação de M.Sc., Instituto de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

URUM, K., PEKDEMIR, T., ÇOPUR, M., 2004, “Surfactants treatment of crude oil contaminated soils”, *Journal of Colloid and Interface Science* 276, pp. 456-464.

VAN KREVELEN, D. W., 1990, *Properties of polymers*. Elsevier Science B. V.

VENKATA RAMANA, K., CHARYULU, N. C. L. N., KARANTH N. G., 1991, “A mathematical model for the production of biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6: production of biomass”, *Journal Chem. Tech. Biotechnol.* v. 51, n. 4, pp. 525-538.

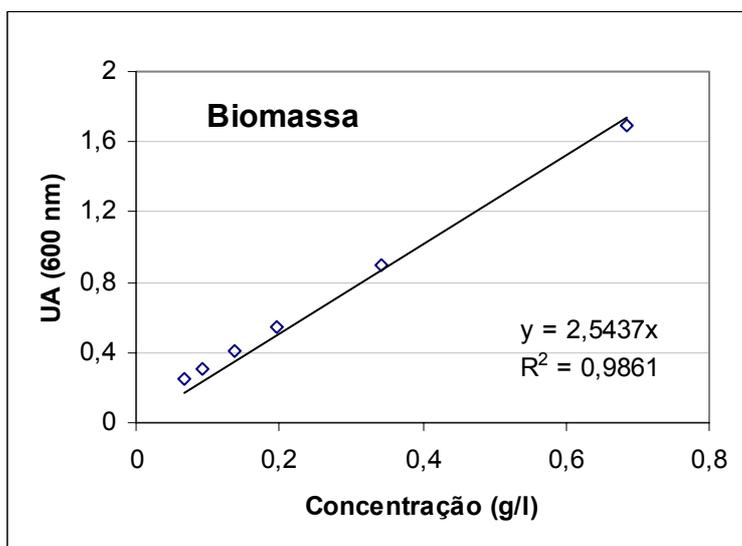
- VLADISAVLJEVIC, G. T., 1999, "Use of polysulfone hollow fibers for bubbleless membrane oxygenation/deoxygenation of water", *Separation and Purification Technology* 17, pp. 1-10.
- WEI, Y., CHOU, C., CHANG, J., 2005, "Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater", *Biochemical Engineering Journal* 27, pp. 146-154.
- WINSTON HO, W. S., SIRKAR, K. K., 1992, "New Membrane Processes under Development". In: *Membrane Handbook*, Part X, New York, Van Nostrand Reinhold.
- WU, J., YEH, K., LU, W. *et al.*, 2007, "Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site", *Bioresour. Technol.*, doi:10.1016/j.biortech.2007.02.026.
- XIE, Y., YE, R., LIU, H., 2006, "Synthesis of silver nanoparticles in reverse micelles stabilized by natural biosurfactant". *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 279, pp. 175-178.

7. Anexos

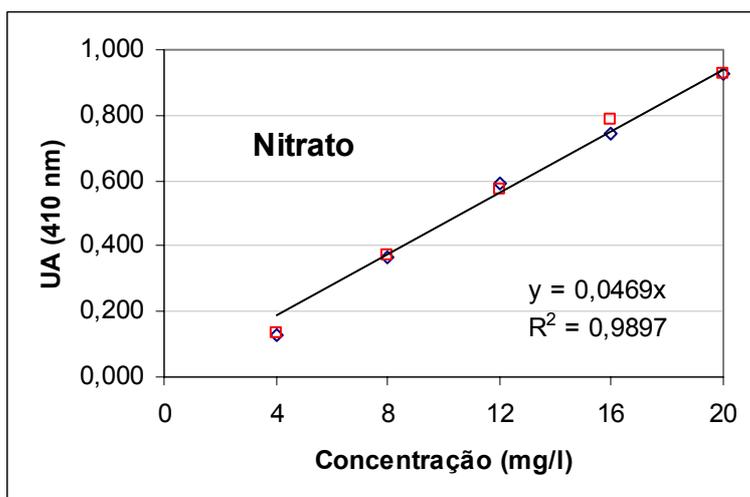
Anexo 1

Curvas de calibração

i) Determinação da concentração de células



ii) Quantificação de nitrato



Anexo 2

Rotinas computacionais utilizadas na simulação do contactor gás/líquido – oxigenação de corrente aquosa.

a) Fibras-ocas microporosas simples – escoamento de líquido interno às fibras

Coefficientes de transferência de massa

Aeração - Modelagem

Observações :

- 1) fibras-ocas microporosas
- 2) fluxo de líquido na parte interna das fibras
- 3) escoamento de líquido em regime laminar

Objetivo - Determinar o menor valor para a área de membrana, fornecendo uma quantidade de oxigênio equivalente a determinado valor de Kla , usando a correlação para kL de Harry Futselaar.

Início:

$c := 4$	Concentração de oxigênio na corrente de saída do bio-reator (g/m ³)
$p := .4$	Pressão parcial do oxigênio (atm)
$H := 4.4 \cdot 10^4$	Constante de Henry (atm)
$x := \frac{p}{H}$	Fração molar de oxigênio na fase líquida
$ceq := 1.78 \cdot 10^6 \cdot x$	Concentração de oxigênio no equilíbrio à pressão p (g/m ³)
$ceq1 := \frac{40.5}{5}$	Concentração de oxigênio no equilíbrio à pressão atm (g/m ³)
$V := .01$	Volume do bio-reator (m ³)
$Klah := 10$	Taxa de aeração (1/h)
$Kla := \frac{Klah}{3600}$	Taxa de aeração (1/s)
$d := .001$	Diâmetro interno das fibras (m)
$D := 2.5 \cdot 10^{-9}$	Coefficiente de difusão oxigênio/água na fase líquida (m ² /s)

$N := 200$ Número de fibras (chute inicial)

$X := -Kla \cdot (c_{eq1} - c) \cdot V$ Definição

$C := c_{eq} - c$ Definição

Determinação da área de membrana para determinado valor de vazão de líquido:

$QL1 := .2 \cdot 10^{-6}$ Vazão da corrente líquida por fibra(m³/s)

$QL := N \cdot QL1$ Vazão da corrente líquida (m³/s)

$L := 1$ Comprimento das fibras (m) - atribuição inicial

$$L := \text{root} \left[N - \frac{1}{\pi \cdot d \cdot L} \cdot \left[\frac{d}{1.62 \cdot D^{\frac{2}{3}} \cdot \left(\frac{4}{\pi \cdot N \cdot L} \right)^{\frac{1}{3}}} \cdot (N \cdot QL1)^{\frac{2}{3}} \cdot \ln \left(\frac{C}{C + \frac{X}{N \cdot QL1}} \right) \right], L \right]$$

$L = 0.848$

$A := \pi \cdot d \cdot L \cdot N$

$A = 0.533$

$v := 20\%$ Porcentagem de vazios - porosidade

$At := \frac{A}{v}$ Área total de membrana (m²)

$At = 2.665$

$cR := c - \frac{X}{QL}$ Concentração de oxigênio na corrente de retorno ao bio-reator (g/m³)

$cR = 6.847$

b) Fibras-ocas microporosas simples – escoamento de líquido externo às fibras

Coefficientes de transferência de massa

Aeração - Modelagem

Observações :

- 1) fibras-ocas microporosas
- 2) fluxo de líquido na parte externa das fibras
- 3) escoamento de líquido em regime laminar

Objetivo - Determinar o menor valor para a área de membrana, fornecendo uma quantidade de oxigênio equivalente a determinado valor de K_{La} , usando a correlação para k_L de Harry Futselaar.

Início:

$c := 4$	Concentração de oxigênio na corrente de saída do bio-reator (g/m ³)
$p := .4$	Pressão parcial do oxigênio (atm)
$H := 4.4 \cdot 10^4$	Constante de Henry (atm)
$x := \frac{p}{H}$	Fração molar de oxigênio na fase líquida
$ceq := 1.78 \cdot 10^6 \cdot x$	Concentração de oxigênio no equilíbrio à pressão p (g/m ³)
$ceq1 := \frac{40.5}{5}$	Concentração de oxigênio no equilíbrio à pressão atm (g/m ³)
$V := .01$	Volume do bio-reator (m ³)
$K_{lah} := 10$	Taxa de aeração (1/h)
$K_{La} := \frac{K_{lah}}{3600}$	Taxa de aeração (1/s)
$d := .001$	Diâmetro interno das fibras (m)
$D := 2.5 \cdot 10^{-9}$	Coefficiente de difusão oxigênio/água na fase líquida (m ² /s)
$X := -K_{La} \cdot (ceq1 - c) \cdot V$	Definição
$C := ceq - c$	Definição
$C1 := 3.66 \cdot D$	Definição
$C2 := 1.61 \cdot D$	Definição

$$C3 := \frac{4}{\pi \cdot D \cdot L} \quad \text{Definição}$$

Determinação da área de membrana para determinado valor de vazão de líquido:

$$QL1 := .2 \cdot 10^{-6} \quad \text{Vazão por fibra (m3/s)}$$

$$L := 1 \quad \text{Comprimento das fibras (m) - atribuição inicial}$$

$$N := 200 \quad \text{Número de fibras}$$

$$QL := N \cdot QL1 \quad \text{Vazão da corrente líquida (m3/s)}$$

$$L := \text{root} \left[L - \frac{1}{\pi \cdot d \cdot N} \cdot \left[\frac{QL \cdot d}{C1 + C2 \cdot (C3 \cdot QL)^{\frac{1}{3}}} \cdot \ln \left(\frac{C}{C + \frac{X}{QL}} \right) \right], L \right]$$

$$L = 0.015$$

$$A := \pi \cdot d \cdot L \cdot N \quad \text{Área de troca (m2)}$$

$$A = 9.607 \times 10^{-3}$$

$$v := 20\% \quad \text{Porcentagem de vazios - porosidade}$$

$$At := \frac{A}{v} \quad \text{Área total de membrana (m2)}$$

$$At = 0.048$$

$$cR := c - \frac{X}{QL} \quad \text{Concentração de oxigênio na corrente de retorno ao bio-reator (g/m3)}$$

$$cR = 6.847$$

- c) Fibras-ocas microporosas cobertas com camada superficial densa – escoamento de líquido interno às fibras

Coefficientes de transferência de massa

Aeração - Modelagem

Observações :

- 1) fibras-ocas microporosas cobertas internamente com pele densa de silicone
- 2) fluxo de líquido na parte interna das fibras
- 3) escoamento de líquido em regime laminar

Objetivo - Determinar o menor valor para a área de membrana, fornecendo uma quantidade de oxigênio equivalente a determinado valor de K_{La} , usando a correlação para k_L de H. Futselaar.

Início:

$c := 4$	Concentração de oxigênio na corrente de saída do bio-reator (g/m ³)
$p := .4$	Pressão parcial do oxigênio (atm)
$ceq := 180 \cdot p$	Concentração de oxigênio no equilíbrio à pressão p (g/m ³)
$ceq1 := \frac{40.5}{5}$	Concentração de oxigênio no equilíbrio à pressão atm (g/m ³)
$V := .01$	Volume do bio-reator (m ³)
$K_{lah} := 10$	Taxa de aeração (1/h)
$K_{La} := \frac{K_{lah}}{3600}$	Taxa de aeração (1/s)
$d := .001$	Diâmetro interno das fibras (m)
$D := 2.5 \cdot 10^{-9}$	Coefficiente de difusão oxigênio/água na fase líquida (m ² /s)
$D2 := 2.5 \cdot 10^{-9}$	Coefficiente de difusão oxigênio/silicone (m ² /s)
$l := .000050$	Espessura da pele densa (m)
$kP := \frac{D2}{l}$	Coefficiente de TM (m/s)
$m := 4.5$	Coefficiente de partição silicone/água ($C_{silicone}/C_{água}$)
$kP := kP \cdot m$	Correção do coefficiente de TM

$$c_{eq} := \frac{c_{eq}}{m} \quad \text{Correção da concentração de oxigênio no equilíbrio (g/m3)}$$

$$X := -K_{la} \cdot (c_{eq1} - c) \cdot V \quad \text{Definição}$$

$$C := c_{eq} - c \quad \text{Definição}$$

Determinação da área de membrana para determinado valor de vazão de líquido:

$$L := 1 \quad \text{Comprimento das fibras - atribuição inicial (m)}$$

$$N := 200 \quad \text{Número de fibras}$$

$$QL1 := .2 \cdot 10^{-6} \quad \text{Vazão da corrente líquida por fibra (m3/s)}$$

$$QL := N \cdot QL1 \quad \text{Vazão da corrente líquida (m3/s)}$$

$$L := \text{root} \left[N - \frac{1}{\pi \cdot d \cdot L} \cdot \left[\frac{1}{kP} + \frac{1}{\frac{D}{d} \cdot 1.62 \cdot \left(\frac{4 \cdot QL1}{\pi \cdot D \cdot L} \right)^{\frac{1}{3}}} \right] \cdot QL1 \cdot N \cdot \ln \left(\frac{C}{C + \frac{X}{QL1 \cdot N}} \right) \right], L$$

$$L = 0.983$$

$$A := \pi \cdot d \cdot L \cdot N \quad \text{Área total de membrana(m2)}$$

$$A = 0.618$$

$$cR := c - \frac{X}{QL} \quad \text{Concentração de oxigênio na corrente de retorno ao bio-reator (g/m3)}$$

$$cR = 6.847$$

- d) Fibras-ocas microporosas cobertas com camada superficial densa – escoamento de líquido interno às fibras

Balanco de massa para o gás

Aeração - Modelagem

Observações :

- 1) fibras-ocas microporosas cobertas internamente com pele densa de silicone
- 2) fluxo de líquido na parte interna das fibras
- 3) inclui o cálculo dos β 's

Objetivo - Determinar o menor valor para a área de membrana, fornecendo uma quantidade de oxigênio equivalente a determinado valor de Kla , usando a solução da equação diferencial, obtida pelo balanço de massa para o oxigênio ao longo da fibra, de Hines.

Início

$K := \frac{1}{4.5}$	Coefficiente de partição O2-água/O2-silicone
$p := .4$	Pressão parcial de O2 na corrente gasosa (atm)
$cS := 180p$	Concentração de O2 na superfície da pele de silicone (g/m3)
$c0 := 4$	Concentração de O2 na corrente líquida na entrada do aerador (g/m3)
$R := .0005$	Raio interno da fibra (m)
$l := .000050$	Espessura da pele densa (m)
$D1 := 2.5 \cdot 10^{-9}$	Coefficiente de difusão O2-água (m2/s)
$D2 := 2.5 \cdot 10^{-9}$	Coefficiente de difusão O2-silicone (m2/s)
$Q1 := .2 \cdot 10^{-6}$	Vazão da corrente líquida por fibra (m3/s)
$U := \frac{Q1}{\pi \cdot R^2}$	Velocidade média da corrente líquida em uma fibra (m/s)
$C := K \cdot cS$	Definição
$D := \frac{D1}{U}$	Definição

$$\alpha := \frac{D_2 \cdot R}{K \cdot D_1 \cdot l}$$

Definição

$$\alpha = 45$$

Coefficientes utilizados na resolução da equação diferencial (β 's):

$$i := 0..10$$

$$\beta_0 := \frac{.1853 + 2.1459\alpha}{1 + .8921\alpha}$$

$$\beta_6 := \frac{19.6107 + .7444\alpha}{1 + .0348\alpha}$$

$$\beta_1 := \frac{3.7948 + 1.2688\alpha}{1 + .2291\alpha}$$

$$\beta_7 := \frac{22.7563 + .7014\alpha}{1 + .0285\alpha}$$

$$\beta_2 := \frac{6.9940 + 1.0660\alpha}{1 + .1226\alpha}$$

$$\beta_8 := \frac{25.9006 + .6674\alpha}{1 + .0240\alpha}$$

$$\beta_3 := \frac{10.1592 + .9456\alpha}{1 + .0797\alpha}$$

$$\beta_9 := \frac{29.0443 + .6359\alpha}{1 + .0205\alpha}$$

$$\beta_4 := \frac{13.3138 + .8607\alpha}{1 + .0572\alpha}$$

$$\beta_{10} := \frac{32.1878 + .6080\alpha}{1 + .0178\alpha}$$

$$\beta_5 := \frac{16.4636 + .7963\alpha}{1 + .0437\alpha}$$

	0
0	2.351
1	5.384
2	8.434
3	11.493
4	14.562
5	17.629
6	20.697
7	23.798
8	26.891
9	29.992
10	33.064

$\beta =$

Perfil de concentração de O₂ na corrente líquida em uma fibra (g/m³):

$$z := 1$$

$$r := .0003$$

$$c := C + (c_0 - C) \cdot \sum_i \left[\frac{\left(2 \cdot \alpha \cdot J_0 \left(\frac{\beta_i \cdot r}{R} \right) \right)}{\left[\left[(\beta_i)^2 + \alpha^2 \right] \right] \cdot J_0(\beta_i)} \cdot e^{\frac{-(\beta_i)^2 \cdot D \cdot z}{R^2}} \right]$$

$$c = 6.333$$

$$k := 0..100$$

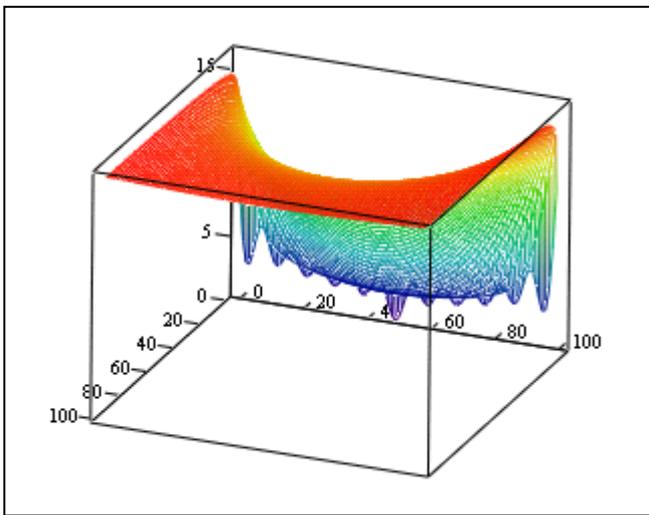
$$j := 0..100$$

$$a_k := \frac{k}{100} \cdot 20$$

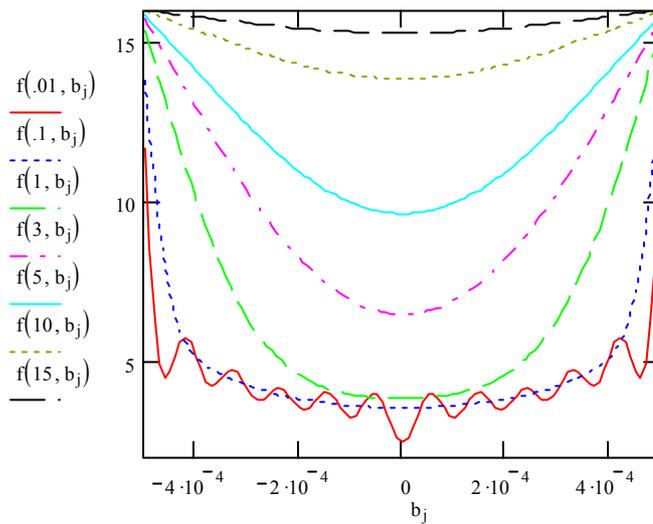
$$b_j := \frac{j}{100} \cdot (.0005 + .0005) - .0005$$

$$f(z,r) := C + (c_0 - C) \cdot \sum_i \left[\frac{\left(2 \cdot \alpha \cdot J_0 \left(\frac{\beta_i \cdot r}{R} \right) \right)}{\left[\left[(\beta_i)^2 + \alpha^2 \right] \right] \cdot J_0(\beta_i)} \cdot e^{\frac{-(\beta_i)^2 \cdot D \cdot z}{R^2}} \right]$$

$$A_{k,j} := f(a_k, b_j)$$



A



Determinação da expressão para a derivada da função do perfil de concentração ao longo da fibra:

$$i := 0.. 1000$$

$$z_i := 2 \cdot \frac{i}{1000}$$

$$R = 5 \times 10^{-4}$$

$$dr := \frac{R}{10000}$$

$$Df_1 := \frac{f[z_i, (R + dr)] - f(z_i, R)}{dr}$$

$$Df_2 := \frac{1}{Df_1}$$

$$\text{Fit} := \text{line}(z, Df_2)$$

Coeficientes do ajuste na forma "a+b*x"

$$\text{Fit} = \begin{pmatrix} 6.088 \times 10^{-6} \\ 1.17 \times 10^{-5} \end{pmatrix}$$

$$\text{corr}(z, Df_2)^2 = 0.985 \quad R^2$$

$$Df(c) := \frac{1}{\text{Fit}_0 + \text{Fit}_1 \cdot c} \quad \text{Derivada da função } c$$

A partir do ajuste da curva da derivada da concentração em relação ao raio, tem-se:

$$K_{lah} := 10 \quad \text{Taxa de aeração (1/h)}$$

$$K_{la} := \frac{K_{lah}}{3600} \quad \text{Taxa de aeração (1/s)}$$

$$V := .01 \quad \text{Volume do bioreator (m3)}$$

$$c_{eq} := \frac{40.5}{5} \quad \text{Concentração de equilíbrio O}_2\text{-água a 1 atm (g/m3)}$$

$$Q_t := K_{la} \cdot V \cdot (c_{eq} - c_0) \quad \text{Quantidade de O}_2 \text{ fornecida / tempo (g/s)}$$

$$Q_t = 1.139 \times 10^{-4}$$

$$L := .695 \quad \text{Comprimento das fibras - atribuição inicial (m)}$$

$$n := 200 \quad \text{Número de fibras}$$

Determinação da quantidade de O2 fornecida / tempo para determinados comprimento e número de fibras:

$$\int_0^L n \cdot 2 \cdot \pi \cdot R \cdot \frac{D1}{Fit_0 + Fit_1 \cdot z} dz = 1.139 \times 10^{-4}$$

$$2 \cdot n \cdot \pi \cdot R \cdot D1 \cdot \frac{(\ln(Fit_0 + L \cdot Fit_1) - \ln(Fit_0))}{Fit_1} = 1.139 \times 10^{-4}$$

Determinação do número de fibras de comprimento L necessárias para o fornecimento de O2 definido pelo valor de Kla:

$$L := \text{root} \left[\left[2 \cdot n \cdot \pi \cdot R \cdot D1 \cdot \frac{(\ln(Fit_0 + L \cdot Fit_1) - \ln(Fit_0))}{Fit_1} - Qt \right], L \right]$$

$$L = 0.695$$

Cálculo da área total de membrana necessária:

$$At := n \cdot 2 \cdot \pi \cdot R \cdot L \quad \text{Área total de membrana (m2)}$$

$$At = 0.437$$

Anexo 3

Raízes da equação transcendental – solução da equação diferencial resultante do balanço de massa

Raízes da equação $\beta^*J_1(\beta)-L*J_0(\beta)=0$

L	β_1	β_2	β_3	β_4	β_5	β_6	β_7	β_8	β_9	β_{10}	β_{11}
0,00	0,0000	3,8137	7,0156	10,1735	13,3237	16,4706	19,6160	22,7600	25,9040	29,0470	32,1900
0,01	0,1412	3,8343	7,0170	10,1745	13,3244	16,4712	19,6170	22,7610	25,9040	29,0470	32,1900
0,10	0,4417	3,8577	7,0298	10,1833	13,3312	16,4767	19,6210	22,7650	25,9080	29,0500	32,1930
0,20	0,6170	3,8835	7,0440	10,1931	13,3387	16,4828	19,6260	22,7690	25,9110	29,0540	32,1960
0,50	0,9408	3,9594	7,0864	10,2225	13,3611	16,5010	19,6410	22,7820	25,9230	29,0640	32,2050
1,00	1,2558	4,0795	7,1558	10,2710	13,3984	16,5312	19,6670	22,8040	25,9420	29,0810	32,2210
2,00	1,5994	4,2910	7,2884	10,3658	13,4719	16,5910	19,7170	22,8480	25,9810	29,1150	32,2520
5,00	1,9898	4,7131	7,6177	10,6223	13,6786	16,7630	19,8640	22,9750	26,0940	29,2170	32,3430
10,00	2,1795	5,0332	7,9569	10,9363	13,9580	17,0099	20,0830	23,1710	26,2700	29,3770	32,4900
100,00	2,3809	5,4652	8,5678	11,6747	14,7834	17,8931	21,0040	24,1150	27,2260	30,3390	33,4510

Ajustes dos valores de β na forma:

$$\beta_n = (a + b*L) / (1+c*L)$$

	β_1	β_2	β_3	β_4	β_5	β_6	β_7	β_8	β_9	β_{10}	β_{11}
a	0,1853	3,7948	6,9940	10,1592	13,3138	16,4636	19,6107	22,7563	25,9006	29,0443	32,1878
b	2,1459	1,2688	1,0660	0,9456	0,8607	0,7963	0,7444	0,7014	0,6674	0,6359	0,6080
c	0,8921	0,2291	0,1226	0,0797	0,0572	0,0437	0,0348	0,0285	0,0240	0,0205	0,0178

Avaliação do ajuste:

	β_1	β_2	β_3	β_4	β_5	β_6	β_7	β_8	β_9	β_{10}	β_{11}
R^2	0,9912	0,9975	0,9981	0,9988	0,9993	0,9996	0,9997	0,9998	0,9999	0,9999	0,9999