

**Aplicação de *Aureobasidium pullulans* isolada do  
filoplano de *Ricinus communis* L. para  
aproveitamento biotecnológico em produtos e  
subprodutos de processos oleoquímicos**

Santa Cruz do Sul, outubro de 2010.

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Betina Klafke Mahl

**Aplicação de *Aureobasidium pullulans* isolada do filoplano de *Ricinus communis* L. para aproveitamento biotecnológico em produtos e subprodutos de processos oleoquímicos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental – Mestrado, Área de Concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Valeriano Antonio Corbellini

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosana de C. de S. Schneider

Santa Cruz do Sul, outubro de 2010

Betina Klafke Mahl

**Aplicação de *Aureobasidium pullulans* isolada do filoplano de *Ricinus communis* L. para aproveitamento biotecnológico em produtos e subprodutos de processos oleoquímicos**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental – Mestrado, Área de Concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

*Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria*  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

*Profa. Dra. Lourdes Teresinha Kist*  
Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC

*Profa. Dra. Rosana de Cassia de Souza Schneider*  
Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC  
Co-orientadora

*Prof. Dr. Valeriano Antonio Corbellini*  
Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC  
Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos professores do curso, principalmente ao professor Dr. Valeriano Corbellini e a professora Dra. Rosana Schneider, que me orientaram na realização deste trabalho, demonstrando sempre disponibilidade e atenção nas tarefas realizadas.

Aos colegas do Mestrado, que sempre demonstraram espírito de grupo, durante as aulas e na realização dos trabalhos.

Aos alunos bolsistas e aos funcionários do Departamento de Química, que sempre que precisei auxílio, estavam prontos para me ajudar.

Ao meu marido e à minha filha que sempre me incentivaram e apoiaram, vocês tornaram esta conquista possível, me acompanhando com amor e compreensão a cada dia.

A todos que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste trabalho.

“A diferença entre possível e impossível está na vontade humana.”

(Louis Pasteur)

## RESUMO

Estudos com microrganismos encontrados no ambiente têm demonstrado grande importância nos processos biotecnológicos que buscam a sustentabilidade. Neste trabalho foi isolada a *Aureobasidium pullulans*, uma levedura do filoplano de *Ricinus communis* e estudado a sua potencialidade de utilização para produção de biossurfactantes, lipase e exopolissacarídeo (pululano). A produção de lipase foi realizada por fermentação submersa; a produção de pululano foi realizada em diferentes meios contendo sacarose e glicerina; e a produção de biossurfactante foi realizada em meio contendo biodiesel, querosene, glicerina e glicose. Após a produção realizou-se a análise de cada produto. Após os testes constatou-se que a levedura em estudo apresenta potencial para desenvolvimento da cadeia oleoquímica, permitindo a utilização de derivados dos óleos vegetais na produção limpa de compostos de interesse industrial, por processo biotecnológico. A lipase produzida apresentou atividade de 0,2 UI após 4 dias de incubação. Na produção de biossurfactante também foi alcançado êxito na aplicação de derivados oleoquímicos na indução da produção pela levedura. Com base nisto, observou-se que o emprego de derivados oleoquímicos como fonte de carbono para *A. pullulans* apresenta um grande potencial para o desenvolvimento regional empregando processos mais limpos.

**Palavras-Chave:** Biodiesel; biossurfactantes; impactos ambientais; pululano, lipase, *Aureobasidium pullulans*.

## ABSTRACT

**Application of *Aureobasidium pullulans* isolated from the phylloplane of *Ricinus communis* L. for use in biotechnology products and byproducts of processes oleochemicals** - Studies with environmental microorganisms have shown great importance in the biotechnological processes that seek sustainability. This work was isolated *Aureobasidium pullulans* that is an yeast from phylloplane of *Ricinus communis* and also was studied its potential use for production of lipase, biosurfactants and exopolysaccharides (pullulan). The lipase production was carried out by submerge fermentation, the production of pullulan was performed in different media containing sucrose and glycerin, and the biosurfactant production was performed in medium containing biodiesel, kerosene, glycerine and glucose. After the production carried out the analysis of each product. It was found that the yeast in this study has potential for development of the oleochemical chain, allowing the use of derivatives of vegetable oils in the cleaner production of compounds of industrial interest by biotechnological process. The lipase activity was 0.2 IU after four days of incubation. Biosurfactant production was also achieved success in the implementation of oleochemical derivatives in inducing the production by yeast. On this basis, it was observed that the use of oleochemical derivatives as a carbon source for *A. pullulans* has great potential for regional development using cleaner processes.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Reação de transesterificação de óleos vegetais.....	25
Figura 2 -	Fluxograma de metodologia adotada na primeira etapa da pesquisa. ....	31
Figura 3 -	Fluxograma da metodologia adotada na segunda etapa da pesquisa. ....	32
Figura 4 -	Precipitação do pululano em ambiente resfriado, após adição de etanol ao sobrenadante.....	39
Figura 5 -	Produção do sabão de cálcio a partir da inoculação da levedura em caldo lipase com <i>Tween</i> 80. ....	41
Figura 6 -	Registro fotográfico da placa onde foi inoculada a levedura da amostra 2 em ágar lipase com rodamina. ....	42
Figura 7 -	Curva de atividade lipase obtida com <i>Aureobasidium pullulans</i> com e sem polipropileno poroso (PPp). ....	43
Figura 8 -	Espectros de infravermelho médios de polipropileno poroso recolhido em diferentes tempos de incubação em caldo lipase inoculado com <i>Aureobasidium pullulans</i> . Seta azul: banda de amida I; seta vermelha: banda de amida II. ....	44
Figura 9 -	Dendrograma de replicatas de espectros de infravermelho de polipropileno poroso recolhido em diferentes tempos de incubação em caldo lipase inoculado com <i>Aureobasidium pullulans</i> . ....	45
Figura 10 -	Registro fotográfico da análise por cromatografia em camada delgada da produção de biodiesel empregando a levedura de <i>Aureobasidium pullulans</i> com emprego de etanol e óleo de mamona como substratos, nos períodos de 48h e 96h. ....	47
Figura 11 -	Registro fotográfico da produção de biossurfactante em meio com biodiesel (A) e querosene (B).....	49
Figura 12 -	Produção de biossurfactante em (1) Kurosawa Glicose, (2) Kurosawa Glicerol, (3) Branco, (4) Querosene, (5) Biodiesel, (6) Glicose. ....	52

Figura 13 - Registro fotográfico do pululano produzido em meio com glicerol (A) e sacarose (B).....	53
Figura 14 - Diagrama de produção do pululano.....	55
Figura 15 - Diagrama de produção de biossurfactante não purificado.....	56
Figura 16 - Representação gráfica dos impactos identificados durante a produção de pululano.....	59
Figura 17 - Representação gráfica dos impactos identificados na produção de biossurfactante.....	61

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1 -</b>	Funções e aplicações industriais dos biossurfactantes.....	23
<b>TABELA 2 -</b>	Pontos de coleta das folhas de mamona. ....	33
<b>TABELA 3 -</b>	Identificação das amostras que apresentaram presença de leveduras. ....	40
<b>TABELA 4 -</b>	Índice de emulsificação obtida para os experimentos realizados com querosene e biodiesel. ....	50
<b>TABELA 5 -</b>	Índice de emulsificação do segundo ensaio de produção de biossurfactantes. ....	50
<b>TABELA 6 -</b>	Índice de emulsificação realizado em meio Kurosawa utilizando glicose e glicerol como indutores da produção de biossurfactantes.....	51
<b>TABELA 7 -</b>	Produção de pululano em meio contendo sacarose e glicerol....	53
<b>TABELA 8 -</b>	Matriz de identificação qualitativa de impactos ambientais da produção de biomassa de <i>Aureobasidium pullulans</i> e purificação do pululano. ...	58
<b>TABELA 9 -</b>	Matriz de identificação qualitativa de impactos ambientais da produção de biossurfactante com o emprego de <i>Aureobasidium pullulans</i> . ....	60

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	14
1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	16
1.1 Produtos e subprodutos de processos oleoquímicos .....	16
1.2 Leveduras .....	16
1.3 Levedura <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	18
1.4 Lipases.....	19
1.5 Produção de biossurfactantes.....	20
1.6 Produção de biodiesel.....	24
1.7 Exopolissacarídeos .....	26
1.8 Avaliação de impactos ambientais .....	28
1.8.1 Matriz de Leopold.....	29
2 METODOLOGIA .....	31
2.1 Delineamento da pesquisa.....	31
2.2 Coleta das folhas de mamona ( <i>Ricinus communis</i> ) .....	32
2.3 Isolamento de leveduras .....	33
2.4 Manutenção e caracterização das leveduras .....	34
2.5 Seleção de leveduras com ação lipolítica .....	34
2.5.1 Em ágar lipase com Tween 80.....	34
2.5.2 Em ágar lipase com rodamina.....	34
2.6 Manutenção dos isolados e preparação do inóculo .....	35

2.7	Produção de lipase em presença de Polipropileno poroso (PPp)	35
2.8	Determinação da atividade lipase	36
2.9	Ensaio de biodiesel	36
2.9.1	Ampliação de biomassa	36
2.9.2	Reação de etanolise do óleo de mamona	37
2.10	Ensaio de produção de biossurfactantes	38
2.11	Produção de exopolissacarídeo pululano	38
2.12	Análise dos Impactos Ambientais	39
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
3.1	Isolamento	40
3.2	Seleção de levedura com potencial lipolítico	41
3.3	Análise da atividade lipase	42
3.4	Avaliação do potencial biotecnológico de <i>Aureobasidium pullulans</i>	46
3.4.1	Produção de biodiesel	46
3.5	Produção de biossurfactante	47
3.5.1	Produção de pululano	52
3.6	Avaliação dos Impactos Ambientais	54
3.6.1	Da produção de pululano	54
3.6.2	Da produção de biossurfactante	55
3.6.3	Matriz de interação de Leopold	56
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
	ANEXO A –	64
	ANEXO B -	65

REFERÊNCIAS.....66

## INTRODUÇÃO

O ser humano tem utilizado de forma indiscriminada os recursos naturais disponibilizados pelo planeta, sem se preocupar com as consequências advindas de tais atitudes. Os reflexos são cada vez mais frequentes e visíveis em nosso meio.

Atualmente, no Brasil, está se pretendendo diversificar a produção de combustíveis com o uso de matérias primas renováveis, como os óleos vegetais. Além disso, os processos de produção também tendem a produção mais limpa, podendo incluir redução de solventes, novos catalisadores, aproveitamentos de resíduos e, emprego de processos biotecnológicos, todos voltados à redução dos impactos ambientais e conseqüentemente a sustentabilidade dos sistemas.

Com relação aos processos biotecnológicos, já no final do século passado em torno de 20% de todas as biotransformações publicadas utilizavam lipases (GITLESEN et al., 1997). Mais recentemente, ocorreu um aumento na aplicação de enzimas (amilases, proteases, lipases) como biocatalisadores em diversos processos nas indústrias alimentícias, têxteis, de papel e celulose, detergentes, óleos e gorduras, na síntese de intermediários de fármacos, herbicidas e substâncias químicas finas (HASAN et al., 2006).

Isso se deve ao desenvolvimento tecnológico mundial que a cada dia avança no sentido dos processos biotecnológicos terem uma tendência de prevalecer nas políticas ambientais, pois os processos enzimáticos visam à substituição dos processos químicos convencionais, o que torna o desenvolvimento e o aprimoramento desta tecnologia de suma importância.

Estudos referentes à capacidade enzimática de leveduras do ambiente têm demonstrado um potencial considerável para uso na indústria, os quais produzem menor quantidade de resíduos durante o processo, por serem biodegradáveis e passíveis de renovação por métodos de fermentação. A maioria destas enzimas são importadas e representam alto custo, tornando inviável sua utilização na produção de biodiesel nas pequenas propriedades da região, a partir de óleos vegetais extraídos de plantas oleaginosas como

girassol, mamona, tungue, entre outras. Diversos microrganismos apresentam capacidade de assimilar derivados de petróleo e, esta capacidade está associada as suas adaptações, entre elas a secreção de biossurfactantes, a resistência a substâncias químicas como detergentes e a secreção de enzimas hidrolíticas.

Neste sentido este trabalho vem propor a avaliação da capacidade de produção de enzimas por leveduras isoladas do filoplano da mamona, coletadas na região do Vale do Rio Pardo (Candelária e Santa Cruz do Sul, RS) e seu potencial na produção de biodiesel e na secreção de biossurfactantes, pois o conhecimento de espécies ambientais de leveduras produtoras de moléculas surfactantes e a otimização de sua produção, principalmente a partir de subprodutos como o glicerol, que sobra da produção do biodiesel, poderá agregar valor ao glicerol, aumentando a viabilidade econômica da cadeia produtiva do biodiesel.

Entre os produtos secretados de interesse deste trabalho, produzidos por leveduras destaca-se também a produção de exopolissacarídeos, como o pululano, empregado na produção de alimentos, cosméticos e outros.

Para tanto, também objetivou-se otimizar e avaliar os processos de produção visando a produção mais limpa derivada do uso de processos biotecnológicos.



# 1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

## 1.1 Produtos e subprodutos de processos oleoquímicos

Os estudos em oleoquímica, inseridos numa proposta de sustentabilidade e de conscientização ambiental, têm buscado alternativas ao uso de derivados de petróleo, como combustíveis, ceras, resinas e lubrificantes, uma vez que, estão intimamente ligados à poluição ambiental.

No Brasil, existe uma grande disponibilidade de matéria-prima para a produção de biodiesel, e sua produção está acelerada devido a adição de biodiesel ao diesel derivado de petróleo, assim sendo, a quantidade de glicerol gerada, também está aumentando. Por isso, é necessário buscar alternativas para o uso do glicerol bruto gerado nesta produção. Na forma pura, o glicerol tem várias aplicações industriais (RIVALDI et al., 2007).

Segundo Rivaldi et al. (2007), os processos para a purificação do glicerol incluem várias etapas, representando um custo bastante alto para pequenos e médios produtores de biodiesel. A utilização de processos biotecnológicos na conversão do glicerol, pode agregar maior valor à sua produção.

A produção de biodiesel, a partir de sementes oleaginosas como o girassol e o amendoim que representam uma fonte renovável, produz como subprodutos a torta (sementes compactadas depois da retirada do óleo) e o glicerol, ambos com potencial, pois a torta serve de fonte protéica, podendo ser utilizada na alimentação de animais, e o glicerol, como matéria-prima para a produção de glicerina e resinas (SCHNEIDER, 2010).

## 1.2 Leveduras

São organismos pertencentes ao Reino *Fungi*, que possuem as seguintes características: parede celular rígida, núcleo delimitado por membrana, aclorofilados, de nutrição heterotrófica por absorção dos nutrientes e não formam corpo de frutificação. Geralmente são encontrados em frutos, folhas,

sementes e em outros substratos que apresentam açúcares (FUENTEFRÍA, 2004).

Leveduras “são fungos com certas características em comum, unicelulares, com formas típicas variando entre esféricas, ovais e de perfil elíptico. Comumente sua reprodução é feita por brotamento, embora haja as que apresentam cissiparidade” (BORZANI et al., 2001).

As leveduras presentes no filoplano colonizam as folhas desde o início de seu desenvolvimento, formam uma barreira na superfície foliar e são responsáveis pelo controle biológico natural de diversas doenças. Diversas leveduras (*Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus albidus*, *Pantoea agglomerans* e *Metschnikowia fructicola*) são registradas, em muitos países, como agentes de biocontrole de fitopatógenos (*Botrytis*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Monilia*, *Sclerotinia* e *Erwinia amylovora*). As leveduras agem principalmente por competição de nutrientes e indução de resistência. Por serem eficientes colonizadoras de superfícies foliares, são capazes de consumir nutrientes mais rapidamente do que os fungos fitopatogênicos. Além da competição por nutrientes, as leveduras interagem diretamente com as hifas fúngicas e produzem enzimas líticas da parede celular (MACHADO e BETTIOL, 2010).

Quanto ao acúmulo de óleo as leveduras normalmente, são capazes de produzir lipídeos, no entanto o acúmulo é pouco. Isto se modifica quando os nutrientes disponíveis diminuem (principalmente a fonte de nitrogênio) e desta forma a levedura passa a ter uma produção de lipídios mais elevada. A fonte de carbono é exigida sempre em quantidade elevada (BORZANI et al., 2001).

Com o controle dos nutrientes é possível alcançar um maior teor de lipídios como ocorre com a *Apiotrichum curvatum*, uma levedura com capacidade de produzir lipídeos intracelulares quando cultivadas em meio com condições limitadas de nitrogênio, conforme YKEMA et al. (1990).

Segundo Meesters, Huijberts e Eggink (1996), os microrganismos considerados com potencialidade para a produção de lipídios são os que acumulam mais de 20 % de lipídios em relação ao peso seco das células.

“As leveduras são capazes de modificar gorduras por fermentação, por alteração da composição em ácidos graxos. Essa ação, que é benéfica quando

se trata de matéria graxa de menor qualidade, é realizada por leveduras sintetizadoras de gordura” (BORZANI et al., 2001).

### 1.3 Levedura *Aureobasidium pullulans*

A levedura *A. pullulans* é classificada como: Filo *Ascomycota*, Classe *Dothideomycetes*, Ordem *Dothideales*, Família *Dothioraceae* e Gênero *Aureobasidium* (NATURDATA, 2010).

Ela é comumente encontrada associada ao filoplano de algumas plantas, sendo responsável pelo controle biológico de várias doenças, principalmente as causadas por fungos (MACHADO e BETTIOL, 2010).

De acordo com Chi et al. (2009), vários isolados de *A. pullulans*, apresentam capacidade de produzir várias enzimas, como amilase, lipase, celulase, protease, entre outras. Foi constatado que a lipase bruta produzida, possui alta atividade hidrolítica para azeite, óleo de amendoim, óleo de soja e banha de porco. Constatou-se também que a lipase purificada tem maior atividade hidrolítica para óleo de amendoim. Segundo Liu et al. (2008), as lipases produzidas, têm grande potencial na digestão de vários lipídeos, podendo assim, ser empregadas na produção de biodiesel a partir de óleos saturados excedentes, como é o caso do óleo de amendoim utilizado nos restaurantes da China.

Pesquisas revelam que *A. pullulans* apresenta um potencial significativo na produção de uma glicana, chamada pululana. Cepas de *A. pullulans aubasidani* produziram aubasidana utilizando-se preferencialmente nitrato de sódio, enquanto cepas de *A. pullulans pullulans* produziram pululana utilizando sulfato de amônio. Portanto, cepas de *A. pullulans* podem ter preferências diferentes por fontes de nitrogênio, levando à produção de diferentes exopolissacarídeos (YURLOVA e HOOG, 1997).

Segundo Liu et al. (2009), a levedura *A. pullulans* é amplamente distribuída em ambientes marinhos com condições ambientais variadas, e

mesmo apresentando características fisiológicas diferentes, podem ser aplicadas em diversas biotecnologias industriais.

O *A. pullulans* é uma levedura capaz de demonstrar tolerância significativa em ambientes contaminados com metais pesados, sendo encontrado com frequência em superfícies vegetais contaminadas com cádmio, chumbo, entre outros. As moléculas extracelulares por ela produzida, como o pululano e outros polissacarídeos, aumentam a resistência da levedura em relação a estes metais (CERTIK et al., 2005).

De acordo com Parawira (2008), uma vez que o microrganismo *A. pullulans* é limpo, ele pode ser usado para produzir enzimas que são potencialmente úteis, nas aplicações em produtos farmacêuticos, alimentos, detergentes e transformações bio-orgânicas.

#### 1.4 Lipases

As lipases são enzimas classificadas como hidrolases e atuam sobre a ligação éster de vários compostos, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos. São encontradas na natureza a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. A produção de lipases está amplamente distribuída entre os microrganismos. Entretanto, as lipases fúngicas apresentam maior interesse em virtude de sua maior estabilidade a maiores temperaturas ou variações de pH (CASTRO et al., 2004).

O interesse em utilizar estes biocatalisadores (lipases) na modificação estrutural de óleos e gorduras tem recebido considerável atenção devido, em especial, à sua especificidade em relação ao substrato (CARVALHO et al., 2003).

Embora atualmente as aplicações industriais das lipases estejam concentradas nas indústrias de detergentes, novas aplicações vêm se estabelecendo nos mais diversos campos, tais como, indústria farmacêutica, química fina, cosméticos, oleoquímica, couros, polpa de celulose e papel e no tratamento de resíduos industriais e, particularmente, na indústria de óleos e gorduras. Os compostos mais expressivos dos óleos e gorduras são os

triacilgliceróis. A reorganização dos ácidos graxos na cadeia principal do triacilgliceróis (interesterificação e glicerólise) e a sua alcoólise são as transformações de maior interesse industrial por melhorar a sua qualidade físico-química como viscosidade e ponto de fusão, para fins alimentícios ou para adequar a sua utilização como combustível renovável – biodiesel – em substituição ao diesel convencional (CASTRO et al., 2004).

As lipases catalisam uma série de reações que incluem a hidrólise de ligações éster de triacilgliceróis a síntese de uma ligação éster entre um álcool e um ácido carboxílico bem como a reação de transesterificação, que engloba estes dois processos (CASTRO et al., 2004). Os estudos mais recentes destacam a aplicação de lipases na geração de biodiesel, a partir de óleos vegetais como alternativa ao óleo diesel.

A transesterificação particularmente com monoálcoois (alcoólise), especificamente com metanol ou etanol, é a melhor escolha para diminuição da viscosidade de triacilgliceróis, por gerar mistura de ésteres metílicos ou etílicos dos ácidos graxos correspondentes, liberando glicerina como co-produto. O peso molecular destes monoésteres é próximo ao do diesel. Os ésteres de ácidos graxos obtidos são conhecidos como biodiesel e apresentam características físicas semelhantes às do óleo diesel, podendo ser utilizados em motores do ciclo diesel sem nenhuma adaptação (COSTA NETO et al., 2000).

## **1.5 Produção de biossurfactantes**

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras (FONTES et al., 2008).

Os biossurfactantes possuem uma estrutura comum: uma porção lipofílica usualmente composta por cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados à uma porção hidrofílica, que pode ser um éster, um grupo hidróxi, fosfato,

carboxilato ou carboidrato. A maioria dos biossurfactantes são neutros, ou aniônicos variando desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

A maioria dos biossurfactantes microbianos relatados na literatura (FONTES et al., 2008) é de origem bacteriana. As bactérias produtoras mais reportadas são dos gêneros: *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp. e *Arthrobacter* sp. Entretanto, a grande maioria dos biossurfactantes de origem bacteriana não é adequada para utilização na indústria alimentícia, devido a sua possível natureza patogênica. As leveduras também têm sido estudadas para a produção de emulsificantes. Entre as leveduras, espécies de *Candida* e *Yarrowia* têm sido largamente estudadas e empregadas com sucesso na produção de biossurfactantes.

Estes microrganismos são também indicados para a biorremediação de solos contaminados por produzirem bioemulsificantes, como os resultados obtidos com a *Gordonia* sp. (ANISZEWSKI et al., 2010).

Os biossurfactantes também apresentam a vantagem de poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e possuírem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular. Além disto, possuem características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os torna comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência. Outra vantagem reside no fato de serem compostos que não são derivados de petróleo, fator importante à medida que os preços do petróleo aumentam. O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes. Outras aplicações incluem biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a recuperação melhorada de petróleo. Porém, atualmente, as aplicações se distribuem entre os mais diversos setores industriais (NITSCHKE e PASTORE, 2002) (Tabela 1).

Os biossurfactantes apresentam como característica, a detergência, que permite quebrar as moléculas dos óleos, tornando-os assimiláveis pelo microrganismo e assim influenciando na produção de biomassa e

consequentemente numa expressiva produção de biomoléculas, havendo a liberação extracelular do mesmo (BARBOSA e PAZ, 2007).

O meio de produção destes biossurfactantes, comumente, exige a presença de glicose ou sacarose, os quais podem ser substituídos por outras fontes de carbono como a glicerina, que tem crescido em produção em função da intensificação da produção de biodiesel no Brasil e em outros países (FONTES et al., 2008). Os preços deste co-produto da indústria do biodiesel estão diminuindo, e tendem a diminuir ainda mais, porque o mercado da indústria de cosméticos, alimentos e de outros processos químicos têm uma capacidade limitada de absorção de quantidades maiores da mesma.

Estudos de produção de biossurfactantes também foram realizados empregando linhagens de *Pseudomonas aeruginosas*. Estes microrganismos apresentaram capacidade de produzir biossurfactantes, levando a resultados de até 100% de IE<sub>24</sub> (VIEIRA et al., 2005).

Em estudo realizado por Barbosa e Paz (2007), a produção de biossurfactantes por *Chromobacterium violaceum* utilizando como substrato óleo de pequi foi satisfatório com resultados de 40% de IE<sub>24</sub>.

Estes mesmos autores citam bactérias, leveduras e fungos filamentosos em geral como capazes de produzir agentes de superfície ativa, denominados bioemulsificantes e biossurfactantes em meios contendo glicose, sacarose, etanol, glicerol e outros substratos hidrossolúveis ou hidrocarbonetos que são substratos hidrofóbicos, ambos como fonte de carbono (BARBOSA e PAZ, 2007).

**TABELA 1 -** Funções e aplicações industriais dos biossurfactantes

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

Fonte: NITSCHKE e PASTORE (2002).

Os biossurfactantes ganharam importância nos campos de biorremediação ambiental, recuperação aprimorada de petróleo, processamento de alimentos e produtos farmacêuticos, devido às suas propriedades únicas, como biodegradabilidade e menor toxicidade. No entanto, a produção em larga escala destas moléculas, não acontece devido aos baixos rendimentos nos processos de produção, recuperação e purificação e de altos



custos. É necessário, conforme Muthusamy (2008), adotar processos de produção economicamente atrativos, com o uso de matérias-primas mais baratas e otimizar os bioprocessos, para a obtenção da máxima produtividade.

## **1.6 Produção de biodiesel**

De um modo geral, biodiesel foi definido pela “Nacional Biodiesel Board” dos Estados Unidos como o derivado monoalquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais ou gordura animal, cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão (motores do ciclo Diesel) (USA, 2008).

No Brasil a Agência Nacional do Petróleo (ANP) define biodiesel da mesma forma: “O biodiesel B100 é um combustível composto de alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais”.

O Biodiesel é sintetizado a partir da transesterificação (Figura 1) de óleos vegetais ou animais com metanol ou etanol na presença de um catalisador ácido ou básico. É uma alternativa atraente, pois é produzido a partir de recursos renováveis e é reconhecido mundialmente por ser um combustível com características não tóxicas e biodegradáveis. Assim, a partir da transesterificação reduz-se a viscosidade dos triacilgliceróis, melhorando as propriedades físicas dos combustíveis para motores a ciclo diesel (CLARK et al., 1984).

O biocombustível produzido destas matérias-primas apresenta considerável redução na emissão de gases poluentes e material particulado, quando comparado com o combustível fóssil, óleo diesel que atualmente domina o mercado (AGRAWAL et al., 2006; SIDHU et al., 2001; ROPKINS et al., 2007; CORRÊA e ARBILLAB, 2008).

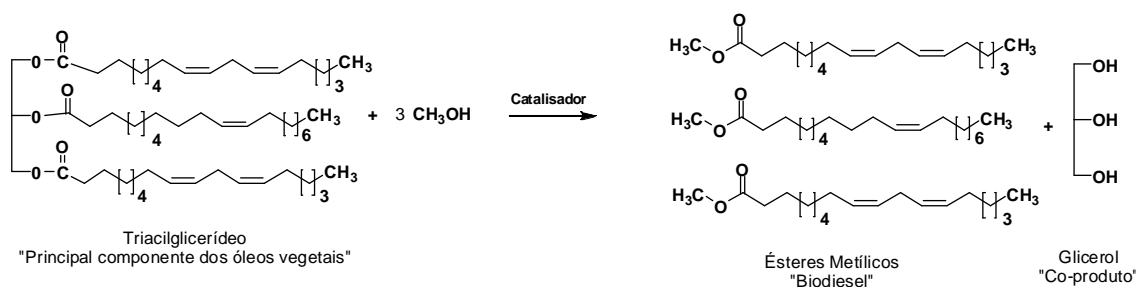


Figura 1 - Reação de transesterificação de óleos vegetais.

Melhorias no processo de produção de biodiesel têm sido feitas e a projeção de novas rotas de produção, consideram aspectos tecnológicos, sustentabilidade do processo e a redução de resíduos (HUO et al., 2009; SALIS et al., 2005; ROSSI et al., 2008; GARCIA et al., 2008; HERNANDO et al., 2007).

Assim ocorrerá uma maior disponibilidade de tecnologias tornando o preço deste combustível cada vez mais competitivo.

No que se refere à produção de biocombustíveis, os processos de transesterificação com utilização de catalisadores químicos são os mais utilizados, no entanto, o emprego de biocatalisadores tem sido, cada vez mais, explorado (GRANADOS et al., 2007; ALONSO et al., 2007; ISO et al., 2001; MARTÍN e OTERO, 2008). Isto se deve ao fato de a grande maioria dos processos produtivos de biodiesel serem realizados com a utilização de catalisadores ácidos ou básicos homogêneos, exigindo um eficiente sistema de remoção destes após a reação, tornando os processos relativamente mais caros e ambientalmente mais impactantes (KAERCHER, 2009).

Muitos aspectos, tais como, o tipo de catalisador, proporção molar entre a matéria graxa e o álcool, temperatura, pureza dos reagentes e o conteúdo de ácidos graxos livres, têm influência no curso da reação de transesterificação e devem ser otimizados. Assim, em geral, na transesterificação de óleos vegetais é importante que sejam controlados a quantidade de catalisador; presença de

água no meio, relação molar entre os reagentes ou substratos, tempo e temperatura de reação e sistema de agitação (KAERCHER, 2009).

O percentual de água nos reagentes quando é usada a catálise química é um fator determinante para o rendimento da reação, o que pode não ser limitante na reação com biocatalisador (BRADSHAW e MEULY, 1944; FREEDMAN et al., 1984; FEUGE e GROSE, 1949).

Como a reação é reversível, faz-se necessário o excesso de álcool para forçar o equilíbrio para o lado do produto desejado, aumentando o rendimento e também para permitir a posterior separação dos ésteres do glicerol. A estequiometria da reação de transesterificação requer três mols de álcool por mol de triacilglicerol, para render três mols de ésteres e um mol de glicerol como mostrado na Figura 1.

Os álcoois apropriados são de cadeia curta como, metanol, etanol, propanol, butanol ou álcool amílico. O metanol e o etanol são utilizados comercialmente e, a nível mundial o metanol detém um lugar de destaque devido a seu baixo custo, propriedades química e física, e ser facilmente disponível como álcool absoluto (FUKUDA et al., 2001). Assim, alta relação molar óleo-álcool resulta numa maior conversão em ésteres em menor tempo de reação.

Na reação de transesterificação, os triacilgliceróis sofrem reações consecutivas e reversíveis. A primeira etapa é a conversão dos triacilgliceróis em diacilgliceróis, seguida pela conversão dos diacilgliceróis em monoacilgliceróis e, sucessivamente, dos monoacilgliceróis ao glicerol, rendendo uma molécula de éster em cada etapa (FUKUDA et al., 2001).

## **1.7 Exopolissacarídeos**

Os exopolissacarídeos (EPS) são definidos como polissacarídeos extracelulares, também chamados glicanas, macromoléculas naturais encontradas em todos os organismos vivos, constituindo um grupo de

compostos dos mais abundantes e importantes da biosfera, como por exemplo, celulose e amido nas plantas (GLAZER e NIKAIDO, 1995) e glicogênio nos animais.

Dependendo do sistema microbiano, alguns exopolissacarídeos formam cápsulas ao redor da célula tornando-se parte da parede celular, enquanto outros formam limos fora da parede celular e têm habilidade para se difundirem dentro da fase líquida durante o processo de fermentação.

Nos fungos, os EPS constituem uma importante percentagem da biomassa, participando com mais de 75% dos polissacarídeos constituintes da parede da hifa (GUTIÉRREZ et al., 1996).

O polissacarídeo mais importante, obtido por fermentação, foi o dextrana, cujo processo de fabricação foi descrito somente no século XX (LIMA et al., 1992). E, foi a partir da dextrana que os estudo dos exopolissacarídeos microbianos se desenvolveu, inicialmente de bactérias e posteriormente, por fungos, dentre os quais o mais estudado tem sido o *A. pullulans* (SEVIOUR et al., 1992).

O pululano é um exopolissacarídeo produzido pelas células leveduriformes de *A. pullulans* no final exponencial e no início da fase estacionária das culturas. Ele pode formar filmes que são transparentes, resistentes ao óleo e impermeáveis ao oxigênio, podendo ser usados como material de revestimento de embalagens, agente de dimensionamento de papel ou um substituto do amido nas formulações de alimentos de baixa caloria, emulsões cosméticas e outras aplicações industriais, como a farmacêutica e química. O processo de preparação de pululano varia conforme a aplicação pretendida (WU et al., 2009).

Uma característica indesejável da maioria das cepas de *A. pullulans* é a produção de pigmento escuro, que é um composto de melanina aparecendo a cor preta, sendo um dos principais obstáculos na produção de pululano (SILVA et al., 2008).

Para uso como adesivos industriais, dispersantes e coagulantes, o caldo de fermentação é simplesmente concentrado, seco e pulverizado. Para uso em aplicações de alimentos, a cultura é descolorida usando carvão ativado,

concentrada, seca e pulverizada. Para uso farmacêutico, o caldo de fermentação é purificado por filtração, descolorida usando carvão seguido por dessalinização, concentração, secagem e pulverização. Apesar de os métodos citados acima produzirem pululano, eles não são as formas mais adequadas para a sua produção, porque é importante a remoção das proteínas produzidas durante a fermentação. A secagem, também não é um processo adequado para a produção de pululano devido a retenção da maioria das impurezas no produto final, enquanto que na precipitação com etanol pode resolver parcialmente esse problema, porque algumas das impurezas podem ser dissolvidas no sistema água-etanol e podem ser separadas do produto após precipitação de etanol. Além disso, descoloração com carvão, pode resultar em significativa perda de pululano (WU et al., 2009).

## **1.8 Avaliação de impactos ambientais**

Sendo os impactos ambientais uma cadeia de efeitos que se produzem no meio natural e social, como consequência de uma determinada ação, as avaliações de impactos são consideradas uma dimensão política de gerenciamento, educação da sociedade e coordenação de ações impactantes, pois permite a incorporação de opiniões de diversos grupos sociais (MOTA, 2003; SILVA, 1996).

A partir do melhor entendimento da cadeia de geração de resíduos, as políticas de controle de poluição evoluíram dos métodos conhecidos como de “fim-de-tubo” para as tendências mais recentes, baseadas no princípio de prevenção, que modificou a abordagem convencional de “O que fazer com os resíduos?” para “O que fazer para não gerar resíduos?”. Sobre este último princípio fundamenta-se a Produção mais Limpa (CNTL, 2003).

Esta nova abordagem sobre a questão dos resíduos levou a uma mudança de paradigma. O resíduo, que antes era visto apenas como um problema a ser resolvido, passou a ser encarado também como oportunidade de melhoria. Isto só foi possível após a percepção de que o resíduo não era inerente ao processo, mas pelo contrário, era um claro indicativo da ineficiência

deste. Portanto, é a identificação e análise do resíduo que dará início à atividade de avaliação de Produção mais Limpa.

Neste contexto, o emprego da biotecnologia ainda é pouco explorado em função do custo da modificação mais drástica dos processos.

### 1.8.1 Matriz de Leopold

A Matriz de Interação (LEOPOLD et al., 1971), utilizada neste trabalho qualifica os impactos seguindo critérios com características de valor, ordem, espaço, tempo, dinâmica e plástica. Após lançados na matriz, as ações impactantes são multiplicadas pelos fatores ambientais resultando em impactos identificados, os quais apresentam subsídios para adoção de medidas ambientais minimizadoras ou potencializadoras.

Os impactos aos meios físicos, bióticos e antrópicos provenientes das etapas do processo produtivo são plotadas na matriz de interação e correlacionados com cada elemento do meio.

Para qualificar os impactos, adotam-se os critérios apresentados por Silva (1996), que estão caracterizados a seguir.

- Características de Valor:

a) *Impacto positivo*: quanto uma ação causa melhoria da qualidade de um parâmetro;

b) *Impacto negativo*: quando uma ação causa dano à qualidade de um parâmetro.

- Características de Ordem:

a) *Impacto direto*: quando resulta de uma simples relação de causa e efeito;

b) *Impacto indireto*: quando é uma reação secundária em relação à ação.

- Características Espaciais:

a) *Impacto local*: quando a ação circunscreve-se ao próprio sítio e suas imediações;

b) *Impacto regional*: quando um efeito se propaga por uma área além das imediações;

c) *Impacto estratégico*: o componente é afetado coletivo, nacional ou internacional.

- Características Temporais:

a) *Impacto em curto prazo*: quando o efeito surge no curto prazo (a determinar);

b) *Impacto em médio prazo*: quando o efeito se manifesta no médio prazo (a determinar);

c) *Impacto em longo prazo*: quando o efeito se manifesta no longo prazo (a determinar).

- Características Dinâmicas:

a) *Impacto temporário*: quando o efeito permanece por um tempo determinado;

b) *Impacto Cíclico*: quando o efeito se faz sentir em determinados períodos;

c) *Impacto permanente*: executada a ação, os efeitos não cessam de se manifestar num horizonte temporal conhecido.

- Características Plásticas:

a) *Impacto reversível*: a ação cessada, o fato ambiental retorna às condições originais;

b) *Impacto irreversível*: quando cessada a ação, o fator ambiental não retorna às suas condições originais, pelo menos num horizonte de tempo aceitável pelo homem.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Delineamento da pesquisa

A metodologia do presente trabalho parte da coleta de folhas de *Ricinus communis*, isolamento, seleção, caracterização e bioampliação de leveduras, como mostra a Figura 2.

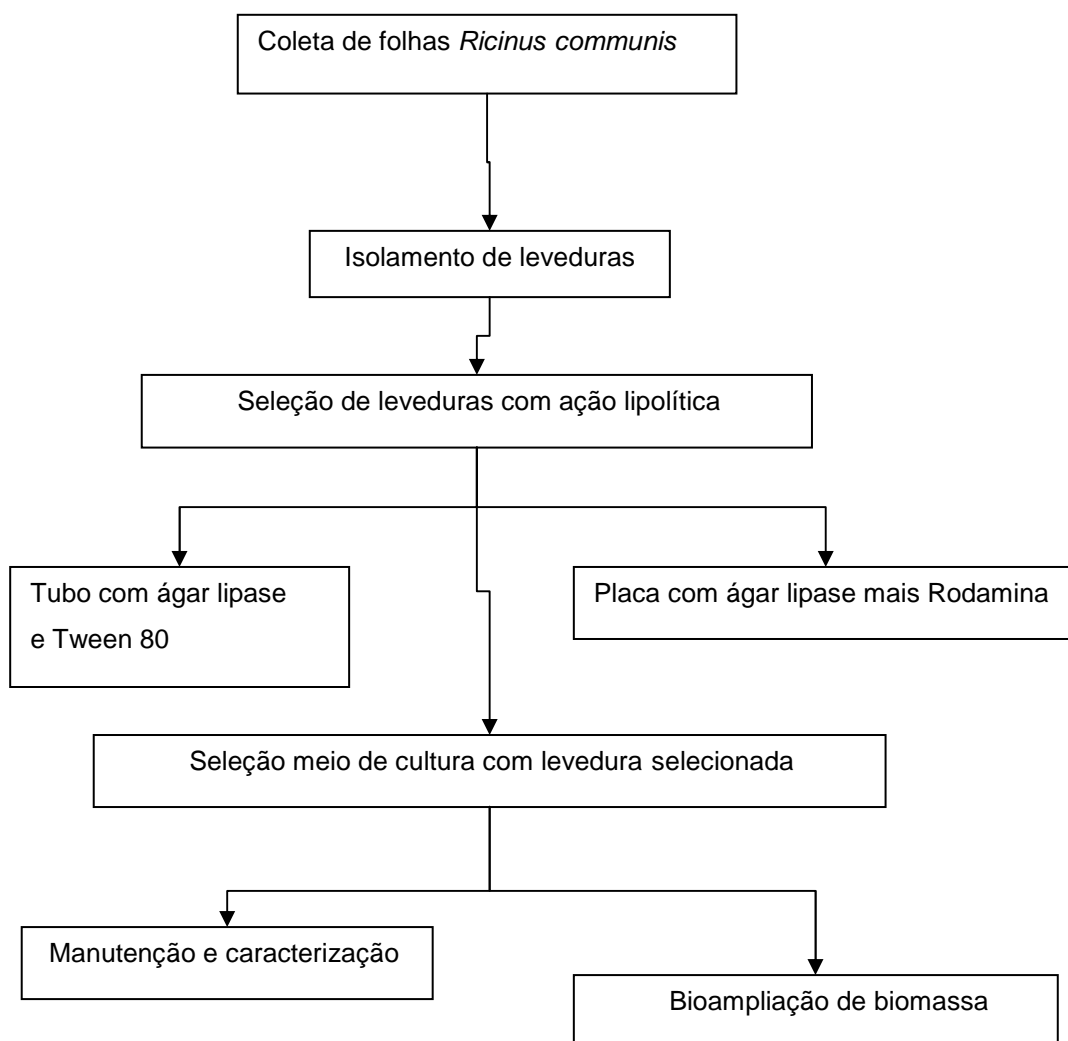


Figura 2 - Fluxograma de metodologia adotada na primeira etapa da pesquisa.



Após bioampliação de biomassa, análise de secreção e aplicação de lipases para produção de biodiesel, de exopolissacarídeos e de biossurfactantes, como mostra a Figura 3.

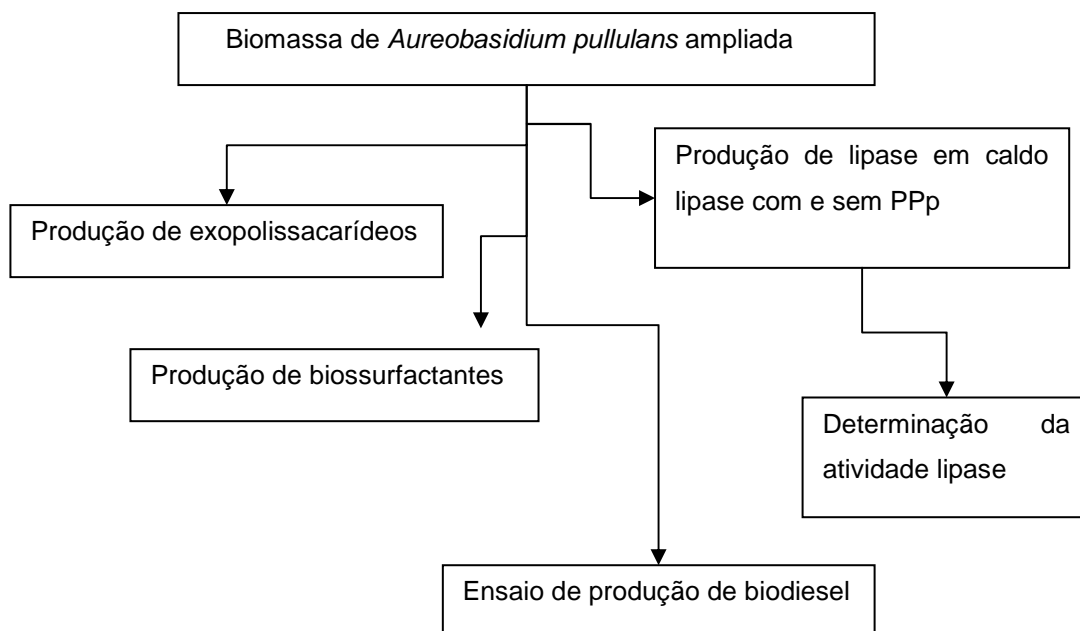


Figura 3 - Fluxograma da metodologia adotada na segunda etapa da pesquisa.

## 2.2 Coleta das folhas de mamona (*Ricinus communis*)

As folhas foram coletadas em Candelária (Centro e interior) e em Santa Cruz do Sul (Bairros Verena e Universitário), conforme Tabela 2, e colocadas em sacos plásticos individuais e levadas ao laboratório de microbiologia da UNISC, onde foram lavadas com água destilada estéril para retirada da poeira acumulada e outras substâncias eventualmente presentes.

**TABELA 2 -** Pontos de coleta das folhas de mamona.

<b>Amostra</b>	<b>Local</b>	<b>Cidade</b>
1	Rua Borges de Medeiros	Candelária
2	Pinheiro	Candelária
3	Rua Boa Esperança	Santa Cruz do Sul
4	Rua Liberato V. da Cunha	Santa Cruz do Sul
5	Rua Augusto Spengler	Santa Cruz do Sul
6	Rodoviária	Santa Cruz do Sul
	Rua Borges de Medeiros	Candelária
7	(Arroio Laranjeiras)	
	Rua Julio de Castilhos	Candelária
8	(Arroio Laranjeiras)	

Estes pontos estão apresentados nos mapas do ANEXO A, bem como os registros fotográficos dos locais de coleta, no ANEXO B.

### **2.3 Isolamento de leveduras**

Pedaços de aproximadamente 10 cm<sup>2</sup> do filoplano da mamona foram cortados assepticamente com bisturi estéril, colocados em erlenmeyers com 50 mL de água destilada estéril e mantidos em agitador Shaker com agitação orbital, por 10 minutos. Em seguida, a água foi descartada e foram realizadas duas lavagens consecutivas com 30 mL de uma solução de 0,5% Tween 80, mantendo-se os erlenmeyers em agitador mecânico por 30 minutos em cada lavagem. Diluições decimais seriadas da última lavagem foram semeadas em duplicata pela técnica de espalhamento em superfície (“spread-plate”) em meio YM acidificado (1% glicose, 0,3% extrato de malte, 0,3% extrato de levedura, 0,5% peptona, 2% ágar, pH 4,0) acrescido de 0,04% de cloranfenicol. Após a incubação a 25°C por 7 dias, colônias representativas dos microrganismos

foram selecionadas e isoladas em ágar GYP (2% glicose, 0,5% extrato de levedura, 1% peptona, 2% ágar).

Foram considerados como leveduras verdadeiras os isolados que apresentaram crescimento leveduriforme durante todo o tempo de cultivo (LANDELL et al., 2005).

As amostras que demonstraram maior crescimento foram utilizadas na etapa seguinte.

## **2.4 Manutenção e caracterização das leveduras**

As culturas foram estocadas em ágar GYMP (2% glicose, 2% extrato de malte, 0,5% extrato de levedura, 0,2% fosfato de sódio monobásico e 2% ágar), cobertas por uma camada de óleo mineral estéril e mantidas na geladeira.

Nova repicagem das primeiras amostras foram feitas em tubos de ensaio com tampa, contendo 5 mL de meio GYP, mantidas na estufa a 35°C e, posteriormente enviadas para a caracterização na Universidade Federal do Rio Grande do Sul no Laboratório de Fungos.

## **2.5 Seleção de leveduras com ação lipolítica**

### **2.5.1 Em ágar lipase com Tween 80**

As amostras foram semeadas em caldo lipase (Tween 80 10 g L<sup>-1</sup>, peptona 10 g L<sup>-1</sup>, NaCl 5 g L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1 g L<sup>-1</sup>) e ficaram incubadas na estufa a 30°C por 7 dias. Nestes tubos foi inoculado em triplicata, 10 µL de caldo de cada amostra, em tubos com 4 mL de ágar lipase.

### **2.5.2 Em ágar lipase com rodamina**

Os microrganismos foram inoculados na superfície de placas de Petri contendo ágar lipase (Tween 80 10 g L<sup>-1</sup>, peptona 10 g L<sup>-1</sup>, NaCl 5 g L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub>

anidro 0,5 g L<sup>-1</sup>, ágar 20 g L<sup>-1</sup>), adicionado de solução de rodamina (10 mL L<sup>-1</sup> a 0,001%). As amostras foram incubadas por 7 dias à 30°C e visualizadas sob luz ultravioleta.

## **2.6 Manutenção dos isolados e preparação do inóculo**

Foram feitas repicagens das amostras mantidas em meio GYMP, em tubos de ensaio com tampa contendo 5 mL de meio GYP, que ficaram na estufa a 30°C por 7 dias.

Uma amostra foi inoculada em erlenmeyer contendo 5mL de caldo Sabouraud e incubada sob agitação de 200 rpm por 7 dias à 30°C. Após, foram feitas 10 diluições. A partir da 5ª diluição foi feito o plaqueamento em triplicata pela técnica “pour plate”. O inóculo escolhido foi o da diluição 1.10<sup>6</sup>.

## **2.7 Produção de lipase em presença de Polipropileno poroso (PPp)**

A produção do PPp foi realizada conforme Roehrs (2009). Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram misturados 5 g de PP comercial e 100 mL de tolueno (Nuclear®). A mistura foi aquecida em banho de óleo sob agitação e refluxo até solubilização completa do polímero (cerca de duas horas). A solução foi resfriada à temperatura ambiente (25-30°C) obtendo-se um gel. Em seguida foram adicionados, de uma só vez, 50 mL de hexano (Nuclear®) sob forte agitação mecânica. Após filtração a vácuo foi feito novo tratamento com lavagem com 50 mL de hexano e filtração a vácuo. O resíduo (PP poroso, PPp) foi seco em estufa a 60 °C por 24 h, para diminuir resíduos de solvente. Após, foi liquidificado e peneirado, recolhendo-se a fração com granulometria menor que 1 mm conforme peneira ABNT 18 – mesh 16.

O processo de imobilização consistiu na incubação de 24 erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de caldo lipase e 1 mL de inóculo, por 7 dias a 37 °C e 150 rpm com recolhimento de triplicatas a cada 24 h. Simultaneamente foi realizado processo semelhante acrescido de 500mg de PPp. O conteúdo de cada frasco foi separado por filtração recolhendo-se o PPp. Os caldos foram

armazenados a -5°C até o processamento, sendo submetidos à determinação de atividade lipase.

## **2.8 Determinação da atividade lipase**

Alíquota de 1 mL do inóculo foi misturado a 19 mL de substrato, constituído por emulsão 5% Tween 80 em tampão fosfato de potássio pH 7,0 0,1 mol L<sup>-1</sup>, mantido a 37°C por 30 min no *shaker* com 150 rpm.

A quantidade de ácidos graxos produzidos ao término da reação de hidrólise foi titulada por potenciometria até o ponto final (pH = 9,5), utilizando uma solução de NaOH (Vetec) 0,05 mol L<sup>-1</sup> previamente preparada. O controle deste ensaio foi obtido incubando 1 mL da amostra e 19 mL de substrato separadamente, misturando-os imediatamente antes da titulação.

## **2.9 Ensaio de biodiesel**

Para os testes de produção de biodiesel com a biomassa de levedura selecionada, inicialmente foi realizada a produção de uma maior quantidade de biomassa e depois conduzido todo o material para as reações de etanolise.

### **2.9.1 Ampliação de biomassa**

Amostra de *A. pullulans* cultivada em meio GYP caldo, foi inoculada em 10 erlenmeyers com 200 mL de caldo Sabouraud cada, mantidos durante 10 dias na estufa, à temperatura de 30°C e agitados esporadicamente. Um litro deste material foi distribuído em 5 tubos, centrifugado e, após descartado o sobrenadante, foram adicionados 5 mL de caldo lipase. Uma das replicatas foi armazenada na geladeira para servir de controle e as outras foram levadas para a estufa onde ficaram à temperatura de 30°C. Duas replicatas foram retiradas depois de 24h e as outras duas, após 48h sendo armazenadas a 4°C

até imediatamente antes da centrifugação e determinação da atividade lipase. A biomassa restante foi liofilizada e pesada.

Um outro volume de 1 L, foi centrifugado e, após descartado o sobrenadante, foi distribuído em 2 tubos que foram liofilizados e o peso seco determinado.

## **2.9.2 Reação de etanólise do óleo de mamona**

Para a reação de etanólise do óleo de mamona, foi utilizada a biomassa na íntegra, referente a produção de 2 L no meio Sabouraud. Primeiro foram utilizadas as seguintes condições: 0,5 g de óleo de mamona, biomassa total da levedura, 20 mL de hexano, proporção óleo: metanol de 1:10, temperatura de 37°C, e tempos de 48h e 96h. As reações foram conduzidas em shaker com 250 rpm e monitoradas por cromatografia em camada delgada.

### **2.9.2.1 Análise por cromatografia em camada delgada**

A análise qualitativa do produto da reação de etanólise foi realizada por cromatografia em camada delgada, onde 1 gota das amostras foram diluídas em 1mL de hexano (Nuclear®), da mesma forma que o óleo de partida e o biodiesel (B100), em 3 diferentes frascos. Aplicou-se o óleo, o biodiesel e a amostra na placa de CCD e eluiu-se com hexano (Nuclear®): acetato de etila (Vetec®) (9:1 v/v). As placas cromatográficas de sílica utilizadas no experimento apresentavam medida de 4 cm x 5,5cm (Macherey Nagel®). A revelação das substâncias separadas foi realizada em câmara de iodo, que reage com muitos compostos orgânicos formando complexos de cor café ou amarela.

## 2.10 Ensaio de produção de biossurfactantes

Foram realizados dois ensaios para a produção de biossurfactante.

Primeiro ensaio :

Uma alçada da biomassa de *A. pullulans* cultivada em caldo lipase, foi inoculada em dois conjuntos de triplicata de tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo com a seguinte composição (g L<sup>-1</sup>): nitrato de amônio 1,0; di-hidrogenofosfato de potássio 0,2; sulfato de magnésio hepta-hidratado 0,2; extrato de levedura 1,0; indutor 10,0; água destilada 1L, os quais foram incubados a 37°C por 7 dias. Num conjunto de triplicatas foi utilizado querosene e no outro biodiesel de girassol como indutor. Junto foi incubado um controle sem o inóculo.

No segundo ensaio, os experimentos foram repetidos utilizando 1mL do inóculo diluído (1.10<sup>6</sup>), em triplicata no mesmo meio do primeiro ensaio contendo querosene como indutor e em quintuplicata no meio de Kurosawa (??) com a seguinte constituição: extrato de levedura 0,2 g L<sup>-1</sup>, glicose 12 g L<sup>-1</sup> ou glicerol 6,13 g L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 g L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2 g L<sup>-1</sup>, nitrato de sódio 1,5 g L<sup>-1</sup>, nitrato de potássio 1 g L<sup>-1</sup>.

Para analisar a capacidade de secretar biossurfactante foram colocados 2 mL de cada amostra em novos tubos, adicionados de 2 mL de querosene e agitados no vortex durante 2 min. Depois de 5 min em repouso foi medida a altura da camada emulsificada e a altura total da camada líquida para calcular o índice de emulsificação (IE) (eq. 1).

$$IE = \frac{\text{altura da camada emulsificada} \times 100}{\text{altura total}} \quad (1)$$

## 2.11 Produção de exopolissacarídeo pululano

Para a produção do exopolissacarídeo pululano foi utilizado o meio de Youssef (1999), com a seguinte constituição (g L<sup>-1</sup>): sacarose 50,0; extrato

levedura 2,0;  $K_2HPO_4$  5,0;  $(NH_4)_2SO_4$  0,6;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,2; NaCl 1,0 em 1L de água destilada, pH 5,0.

Após a produção da biomassa, o pululano foi separado da seguinte forma:

- a biomassa em meio aquoso foi centrifugada a 10.000 rpm durante 20 min;

- a biomassa, foi separada do sobrenadante;

- no sobrenadante, foram adicionados dois volumes de etanol e o material foi transferido para um ambiente resfriado a  $7^{\circ}C$ , até a precipitação (Figura 4).

- O precipitado formado foi separado por centrifugação a 3000 rpm e seco a  $37^{\circ}C$  por 72 h. A massa obtida foi registrada.



Figura 4 - Precipitação do pululano em ambiente resfriado, após adição de etanol ao sobrenadante.

## 2.12 Análise dos Impactos Ambientais

Para identificação dos impactos ambientais decorrente da utilização da biomassa para produção de exopolissacarídeo e biossurfactante foi adotado como ferramenta uma Matriz de Interação derivada da matriz de Leopold (LEOPOLD et al., 1971).



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 Isolamento

Após a realização do isolamento em 8 diferentes amostras de folhas de mamona observou-se a presença de leveduras em todos os pontos de coleta (Tabela 3).

**TABELA 3 -** Identificação das amostras que apresentaram presença de leveduras.

Ponto	Frequência de isolamento	
	Abril/2006	Julho/2006
1	-	+
2*	+	+
3	-	+
4	-	+
5	-	+
6	-	+
7	-	+
8	+	+

\* Ponto de coleta localizado no interior de Candelária – RS.

Conforme a Tabela 3 há uma diferença entre a presença de leveduras nos meses de coleta, dando uma indicação de que há uma relação com a época do ano ou com fatores ambientais que possam levar a um aumento ou diminuição das mesmas, no entanto não é possível comprovar esta relação devido ao reduzido número de coletas realizado. Resultado semelhante foi encontrado por McGrath e Andrews (2006), onde o crescimento da levedura *A. pullulans* no filoplano de macieiras apresentou diferenças entre os meses de maio e setembro, sendo que, a partir do mês de julho foi mais acentuado. Estes autores consideraram então que há uma influência da época do ano sobre a presença deste microrganismo. Por outro lado, Machado e Bettiol (2010), destacam que existe relação entre a presença de leveduras e o controle de

fitopatógenos na superfície foliar. Este também pode ser um dos motivos que levaram a um aumento da população de leveduras na segunda coleta.

### 3.2 Seleção de levedura com potencial lipolítico

Na primeira coleta, apenas duas amostras apresentaram crescimento de leveduras, por isso, foi feita nova coleta, da qual, todas as amostras apresentaram crescimento de leveduras.

Deste segundo isolamento, as leveduras crescidas nas amostras dos pontos 2 e 8 foram as mais expressivas com relação a atividade lipase determinada após crescimento em ágar lipase. Para tanto foi observada a altura da coluna de sabão de cálcio (Figura 5).



Figura 5 - Produção do sabão de cálcio a partir da inoculação da levedura em caldo lipase com *Tween* 80.

No ágar lipase com rodamina, também se observou maior atividade das leveduras crescidas na amostra proveniente do ponto 2, conforme Figura 6.

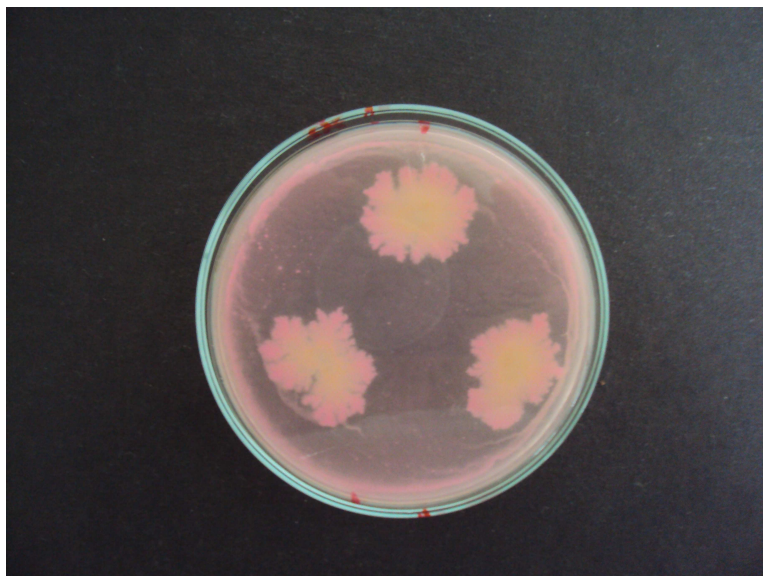


Figura 6 - Registro fotográfico da placa onde foi inoculada a levedura da amostra 2 em ágar lipase com rodamina.

Com base nos resultados obtidos observou-se que a maior atividade foi encontrada para as amostras dos pontos 2 e 8, sendo as do ponto 2, com maior atividade, identificada como *Aureobasidium pullulans*, a qual foi utilizada para a preparação do inóculo.

### 3.3 Análise da atividade lipase

Para a cepa de *A. pullulans* foi realizada a determinação da atividade lipase e a curva de atividade após a determinação, durante 7 dias, está apresentada na Figura 7.

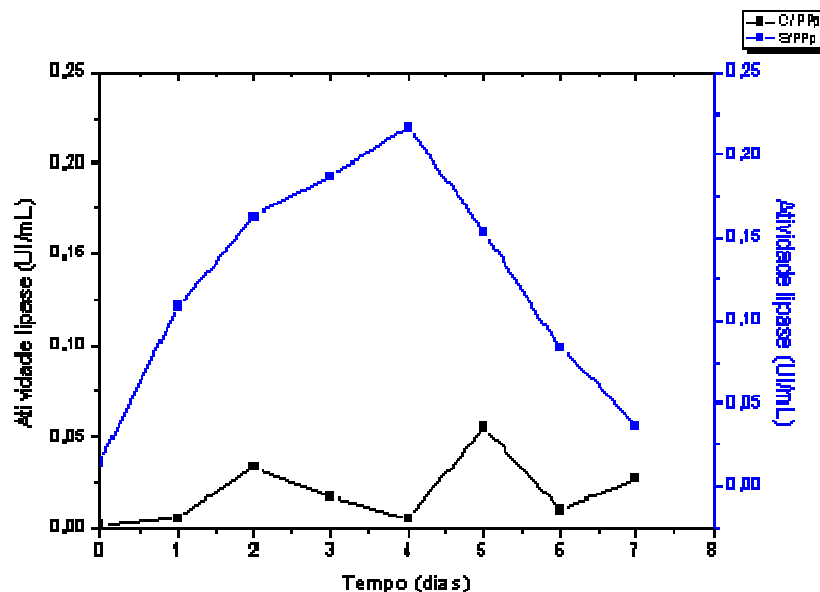


Figura 7 - Curva de atividade lipase obtida com *Aureobasidium pullulans* com e sem polipropileno poroso (PPp).

Observou-se que ocorreu um crescimento da atividade nos primeiros quatro dias, e após há um decaimento gradativo da atividade.

Visando a aplicação da lipase de *A. pullulans* como biocatalisador em reações de etanolise foi estudado o efeito do PPp durante o processo de fermentação para que ocorresse a imobilização simultaneamente ao processo de secreção da lipase, visando manter níveis baixos da mesma no caldo e, conseqüentemente intensificar o *feedback* positivo ou inibir a repressão catabólica da sua produção (ácidos graxos livres e glicerol).

A atividade do material após a imobilização foi determinada da mesma forma que com a lipase livre, e obteve-se um resultado diferente, mostrando que a atividade lipase foi muito reduzida no caldo onde o PPp estava presente, e no PPp analisado separadamente, após retirado do caldo não ocorreu atividade lipase.

Justifica-se este resultado em função da interação dos sítios ativos da lipase com o polímero.

A Figura 8 descreve a variação do perfil de espectros de infravermelho (médias de triplicatas) das amostras de polipropileno poroso incubadas com a

cepa de *A. pullulans*. Observa-se a elevação nas bandas de absorção de amida I ( $\nu\text{C}=\text{O}$ , seta azul) e amida II ( $\nu\text{N}-\text{H}$ , seta vermelha), características de proteínas nas amostras coletadas em 72 e 96 h com diminuição da absorção destas bandas após este período. Estes dados indicam que houve absorção de componentes do meio com características estruturais de proteínas. Esta informação aparentemente correlaciona preferencialmente com a evolução da atividade lipase observada no quarto dia de coleta no caldo em ausência de PPp e, em menor extensão, no caldo em presença de PPp uma vez que neste há uma segundo pico de atividade lipase que não correlaciona com aumento da absorção de proteínas no PPp.

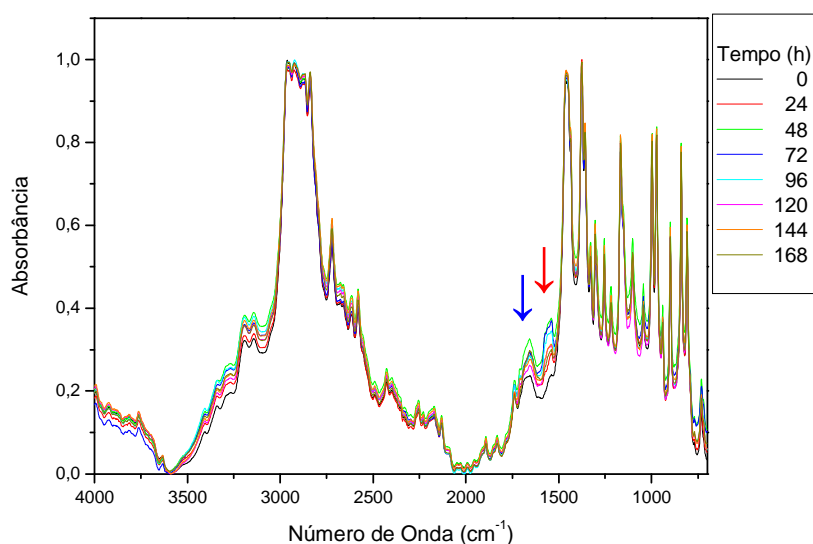


Figura 8 - Espectros de infravermelho médios de polipropileno poroso recolhido em diferentes tempos de incubação em caldo lipase inoculado com *Aureobasidium pullulans*. Seta azul: banda de amida I; seta vermelha: banda de amida II.

A tentativa de correlacionar a atividade lipase no caldo de fermentação em presença de PPp com os respectivos espectros de infravermelho levou a um modelo de baixa qualidade preditiva baseado nas regiões espectrais de

(4000-3700 )+ (3600-3500) + (3000-2900) + (2100-1900) + (1800-1700) + (1600-1500) + (1100-900)  $\text{cm}^{-1}$  com 7 variáveis latentes e um coeficiente de validação cruzada  $R_{\text{val}}$  ( $R^2$ ) de 0,52. O baixo valor de  $R_{\text{val}}$  mostra que a atividade lipase no respectivo caldo incubado com PPp não pode ser explicada somente com base em mecanismos de adsorção hidrofóbica de proteínas do referido caldo sobre o adsorvente. Outros fatores devem ser considerados tais como adsorção de outras proteínas ou outros componentes sem relação com atividade lipase e baixa reprodutibilidade na capacidade adsortiva do PPp o que pode ser confirmado pelo dendrograma das replicatas dos referidos espectros de PPp (Figura 9).

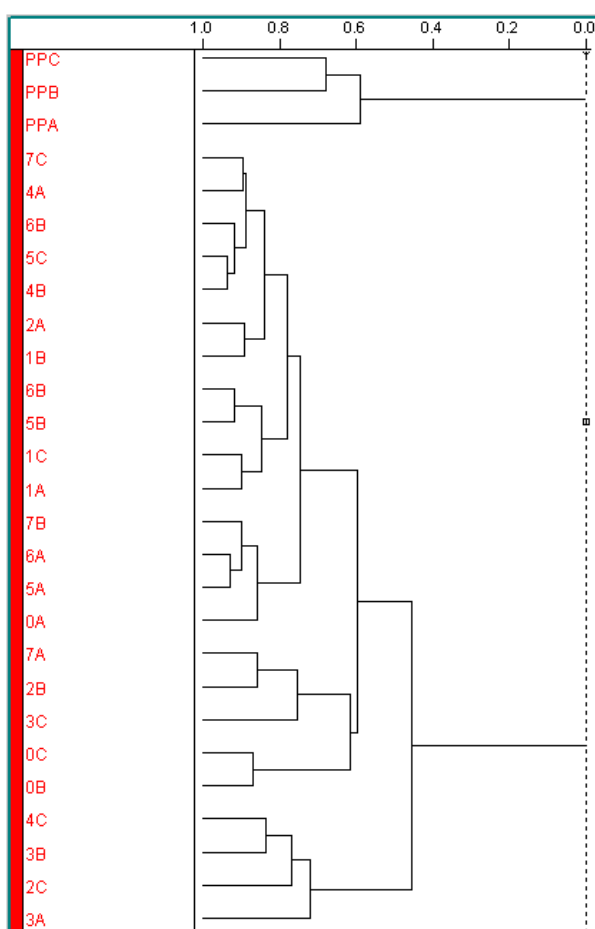


Figura 9 - Dendrograma de replicatas de espectros de infravermelho de polipropileno poroso recolhido em diferentes tempos de incubação em caldo lipase inoculado com *Aureobasidium pullulans*.

A baixa reprodutibilidade nos espectros das replicatas de PPp pode estar associada à ampla faixa de granulometria utilizada, o que pode ser contornado reavaliando futuramente o ensaio com faixa granulométrica menor ou ainda, melhorando a seletividade da adsorção hidrofóbica do PPp com tratamento à base de etanol conforme proposto por Menoncin et al. (2009). Assim, se pode concluir que a presença de PPp em caldo de indução de lipase merece ser melhor investigado pelo potencial de adsorção *in situ* que oferece durante a fermentação e que pode apresentar vantagens em relação à adsorção após a fermentação ter terminado.

### **3.4 Avaliação do potencial biotecnológico de *Aureobasidium pullulans***

Para os testes com a levedura de *A. pullulans* foi inicialmente produzida uma quantidade maior de biomassa num total por L de meio Sabouraud de 201 mg, as quais foram utilizadas nos testes para produção de biodiesel. Para o primeiro ensaio de produção de biossurfactante utilizou-se a biomassa produzida no mesmo meio e bioampliada em caldo lipase.

Para a determinação do potencial lipolítico, para o segundo ensaio de produção de biossurfactante e para a produção de pululano, foi utilizado 1mL do inóculo.

#### **3.4.1 Produção de biodiesel**

Os testes preliminares de produção de biodiesel empregando a levedura não apresentaram, em 48h nem após 96 h, indícios da formação de ésteres etílicos, como mostra a Figura 10.



Figura 10 - Registro fotográfico da análise por cromatografia em camada delgada da produção de biodiesel empregando a levedura de *Aureobasidium pullulans* com emprego de etanol e óleo de mamona como substratos, nos períodos de 48h e 96h.

A potencialidade de emprego da biomassa com a lipase secretada para a produção de biodiesel não foi confirmada e supõe-se que isto se deva a concentração da lipase ainda ser muito baixa para este procedimento, ou a lipase adsorvida da biomassa encontrar-se em uma forma inativa para as reações de transesterificação.

### 3.5 Produção de biossurfactante

A produção de biossurfactante com a levedura *Aureobasidium*, a partir do primeiro ensaio com biomassa pode ser observada na Figura 11, mostrando que a coluna de emulsificação tanto com biodiesel como com querosene foi obtida para os dois substratos hidrofóbicos, podendo ser comparada, conforme Nitschke e Pastore (2002), a alguns microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, considerados por si só como biossurfactantes, como por exemplo, algumas espécies de *Cyanobacteria* e alguns patógenos como *S. aureus* e *Serratia* sp.

Desta forma, pode-se inferir que esta levedura poderá ser testada para biorremediação de ambientes contaminados com poluentes orgânicos, como hidrocarbonetos provenientes da indústria petrolífera, bem como, poderá ser



empregada em processos industriais de produção de biossurfactantes, matéria prima para indústria farmacêutica, de domissanitários e de cosméticos. De acordo com Fontes et al. (2008), algumas leveduras têm sido estudadas para a produção de emulsificadores, entre elas, espécies de *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*, e empregadas com sucesso na produção de biossurfactantes, pois não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, o que permite sua utilização para aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica.

Destaca-se também que a biorremediação de biodiesel em solo pode também ser investigada no futuro.

Com estes resultados constata-se que a *A. pullulans* é um microrganismo versátil para processos industriais e remediação ambiental, uma vez que a capacidade de produzir o biossurfactante induzido pela presença de querosene, mostra que esta levedura pode emulsionar contaminantes do solo (hidrocarbonetos) e, conforme Germida et al. (2002), também pode degradar estes contaminantes e descontaminar o solo.

A diferença entre os comportamentos do biodiesel e da querosene poderia sugerir uma maior estabilidade da emulsão formada pelo biossurfactante com querosene, o que vem ao encontro dos resultados encontrados por Barros et al. (2008). Estes autores sugerem que a estabilidade da emulsão é maior com hidrocarbonetos de cadeia longa, uma vez que eles testaram o diesel e a gasolina, encontrando melhores resultados com diesel, que é composto por uma mistura de hidrocarbonetos de massa molecular mais elevada que a da gasolina.

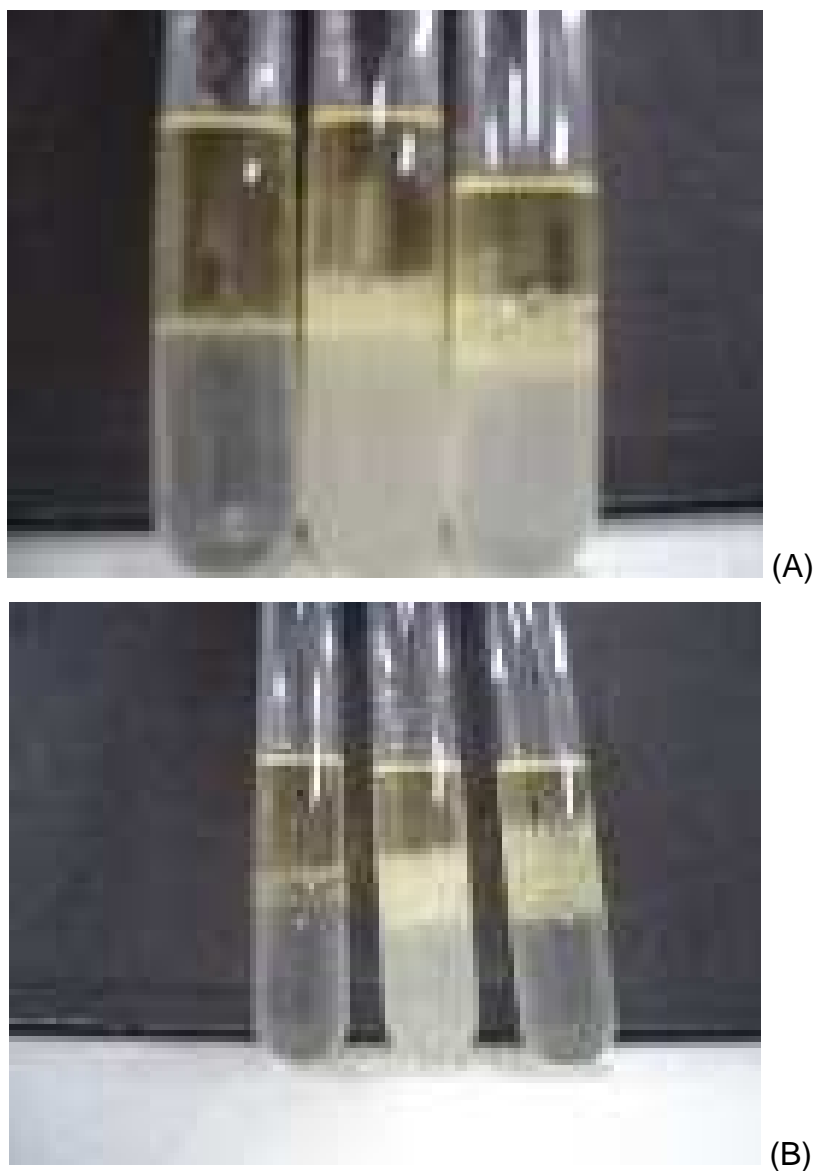


Figura 11 - Registro fotográfico da produção de biossurfactante em meio com biodiesel (A) e querosene (B).

O índice de emulsificação obtido no primeiro ensaio com biodiesel e querosene está apresentado na Tabela 4.

**TABELA 4 -** Índice de emulsificação obtida para os experimentos realizados com querosene e biodiesel.

Amostra	Índice de emulsificação (IE)	
	Meio com biodiesel	Meio com querosene
1	50,0	50,0
2	62,5	75,0
3	71,4	75,0

No segundo ensaio, realizado com o mesmo meio, porém, com mais indutores, observou-se que os melhores resultados foram encontrados com querosene (Tabela 5).

**TABELA 5 -** Índice de emulsificação do segundo ensaio de produção de biossurfactantes.

Amostra	Branco		Querosene		Biodiesel		Glicose	
	0 h	24 h	0 h	24 h	0 h	24 h	0 h	24 h
1	-	-	12,18	7,14	-	-	-	-
2	6,88	1,93	14,06	5,59	-	-	-	-
3	4,67	2,9	12,28	4,67	-	-	-	-

Nos resultados da Tabela 5 observa-se que com biodiesel e glicose não foi possível determinar o índice de emulsificação e, portanto, foi necessário realizar o ensaio em outro meio (Kurosawa), apresentado na Tabela 6.

Os resultados encontrados na Tabela 6 indicam, da mesma forma que no primeiro ensaio, que houve um bom resultado com o glicerol como indutor. Além disso, no meio Kurosawa os resultados para glicose também foram melhores. Os valores foram próximos entre os indutores testados no período de 24 horas (IE24).

**TABELA 6 -** Índice de emulsificação realizado em meio Kurosawa utilizando glicose e glicerol como indutores da produção de biossurfactantes.

Amostra	Glicose		Glicerol	
	0 h	24 h	0 h	24 h
1	4,01	-	16,34	-
2	14,84	-	4,14	-
3	14,79	-	-	-
4	2,18	-	-	-
5	22,12	17,79	15,91	9,94

Observou-se também que durante os sete dias de incubação, do segundo ensaio, visando a produção de biossurfactantes, havia a formação de uma camada de espuma nos meios contendo os indutores testados. Isto demonstra que, mesmo não sendo possível medir a camada de emulsificação, há a formação de biossurfactantes com todos os indutores estudados, e sugere-se que o que ocorre é uma baixa estabilidade da camada de emulsão conforme Barros et al. (2008) discutiram para diesel e gasolina como indutores.

O registro fotográfico dos meios, bem como da coluna de emulsificação formada com cada indutor, encontra-se na Figura 12.

Cabe ressaltar que a continuidade deste trabalho no futuro poderá levar a otimização do processo visando o uso de matérias primas alternativas da indústria oleoquímica para a produção de biossurfactante. Este resultado pode ser associado principalmente à indústria de biodiesel, que gera glicerina (com 85% de glicerol) em grandes quantidades, não assimiladas pelo mercado atual.

Um exemplo de produção de biossurfactantes com levedura e empregando glicerol como fonte de carbono foi obtido com a *Pseudozyma antarctica* após 7 dias de cultivo a 30°C e 100 g L<sup>-1</sup> de glicerol. Neste experimento foi encontrado um rendimento em biossurfactante de 16,3 g L<sup>-1</sup> (MORITA et al., 2007).

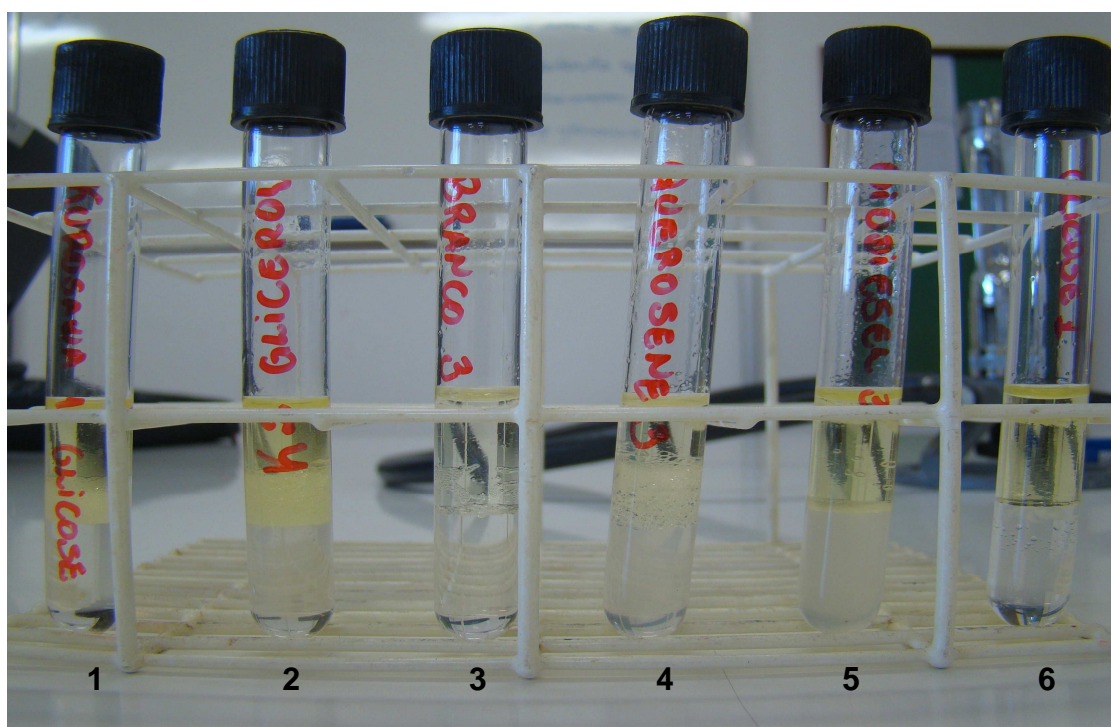


Figura 12 - Produção de biossurfactante em (1) Kurosawa Glicose, (2) Kurosawa Glicerol, (3) Branco, (4) Querosene, (5) Biodiesel, (6) Glicose.

### 3.5.1 Produção de pululano

Os resultados da produção de pululano estão apresentados na Tabela 7, onde observa-se que há uma produção maior no meio contendo sacarose. Este resultado não inviabiliza o uso de glicerol para a produção de pululano, porque ainda existem alternativas para aumentar a massa de exopolissacarídeo produzida. Em trabalhos futuros ainda há a possibilidade de otimizar a bioampliação e realizar os experimentos em meio mais concentrado de células ou ambientar a levedura no meio com glicerol. Desta forma há a possibilidade de alcançar um maior rendimento de produção de pululano.

**TABELA 7 -** Produção de pululano em meio contendo sacarose e glicerol.

Fonte de carbono	Amostras	Pululano (g L <sup>-1</sup> )	Média
Glicerol	g1	1,1	0,45 ± 0,38
	g2	0,12	
	g3	0,24	
	g4	0,46	
	g5	0,3	
Sacarose	a1	4,06	4,22 ± 0,22
	a2	4,32	
	a4	4,04	
	a5	4,48	

Destaca-se que a produção de pululano em meio contendo sacarose como fonte de carbono já havia sido descrita por Roukas e Liakopoulou-Kyriakides (1999), com maior eficiência comparado a outras fontes de carbono, em sistema aerado. Estes autores obtiveram 23 g L<sup>-1</sup> de polissacarídeo. Já outro autor encontrou 4,5 g L<sup>-1</sup> quando uma cepa de *Aureobasidium* foi cultivada em subprodutos do etanol (LEATHERS e GUPTA, 1994).

O pululano produzido nos dois meios, com sacarose e com glicerol, estão apresentados na Figura 13.

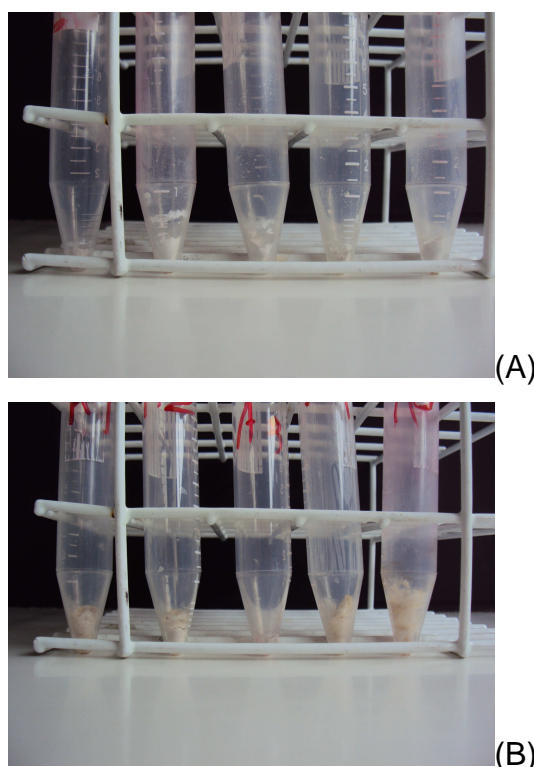


Figura 13 - Registro fotográfico do pululano produzido em meio com glicerol (A) e sacarose (B).

Nestas fotos da Figura 13 observa-se que o produto apresenta a mesma aparência, porém, quantidades diferentes.

### **3.6 Avaliação dos Impactos Ambientais**

A avaliação dos impactos foi realizada para a produção de pululano e de biossurfactante.

#### **3.6.1 Da produção de pululano**

Para viabilizar a produção de pululano empregando *A. pullulans*, as etapas de sua produção estão apresentadas na Figura 14, onde também identifica-se a necessidade de entrada de insumos e energia.

No processo de produção de pululano por *A. pullulans*, não há resíduos e sim consumo de energia para manter a 37°C durante a fermentação e energia para a centrifugação e liofilização. As proteínas que saem do processo podem ser destinadas, por exemplo, para a fabricação de rações animais.

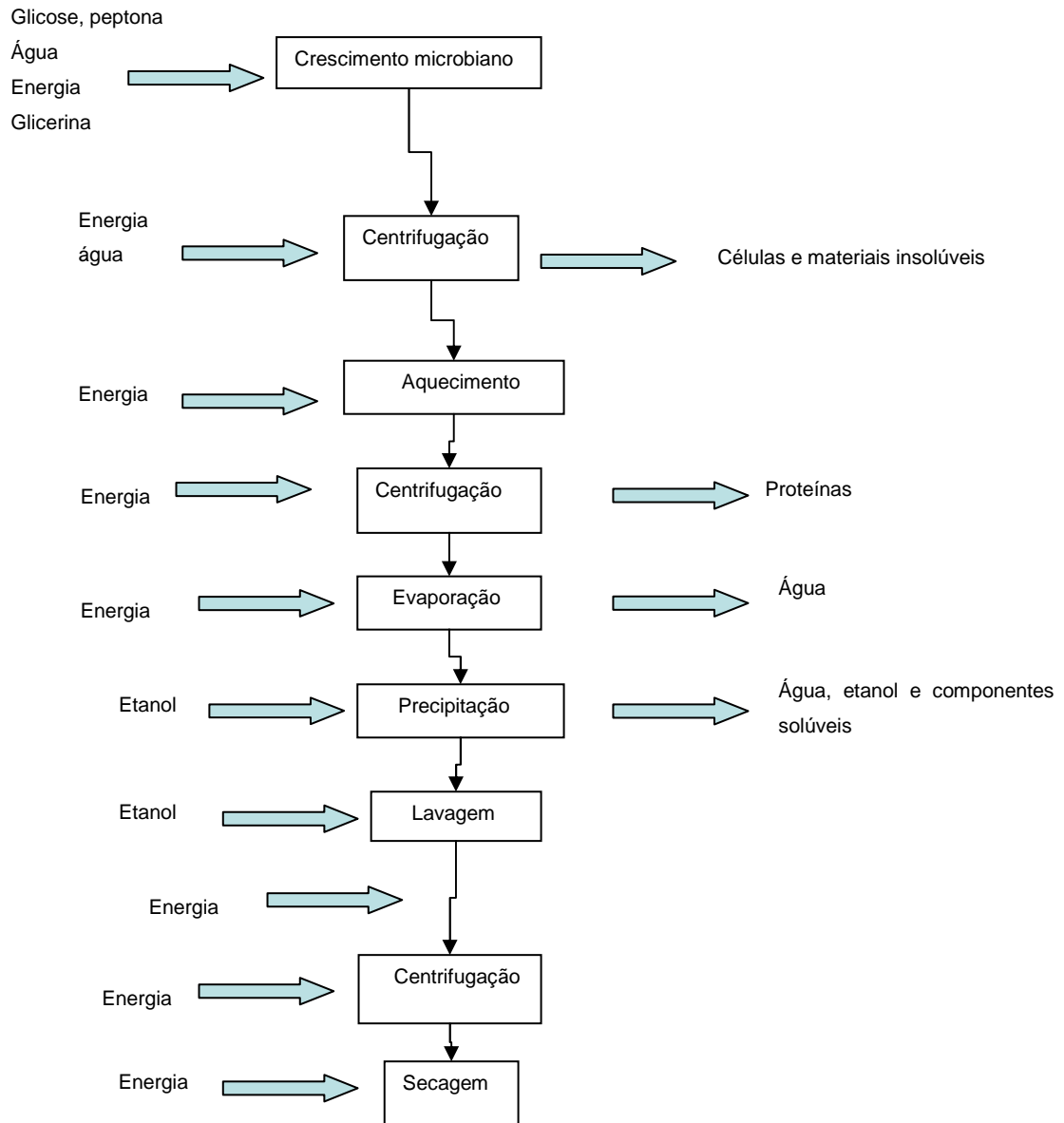


Figura 14 - Diagrama de produção do pululano.

### 3.6.2 Da produção de biossurfactante

Uma alíquota de biomassa foi inoculada em um meio apropriado para a produção de biossurfactante. O fluxo de produção com entradas e saídas está na Figura 15.



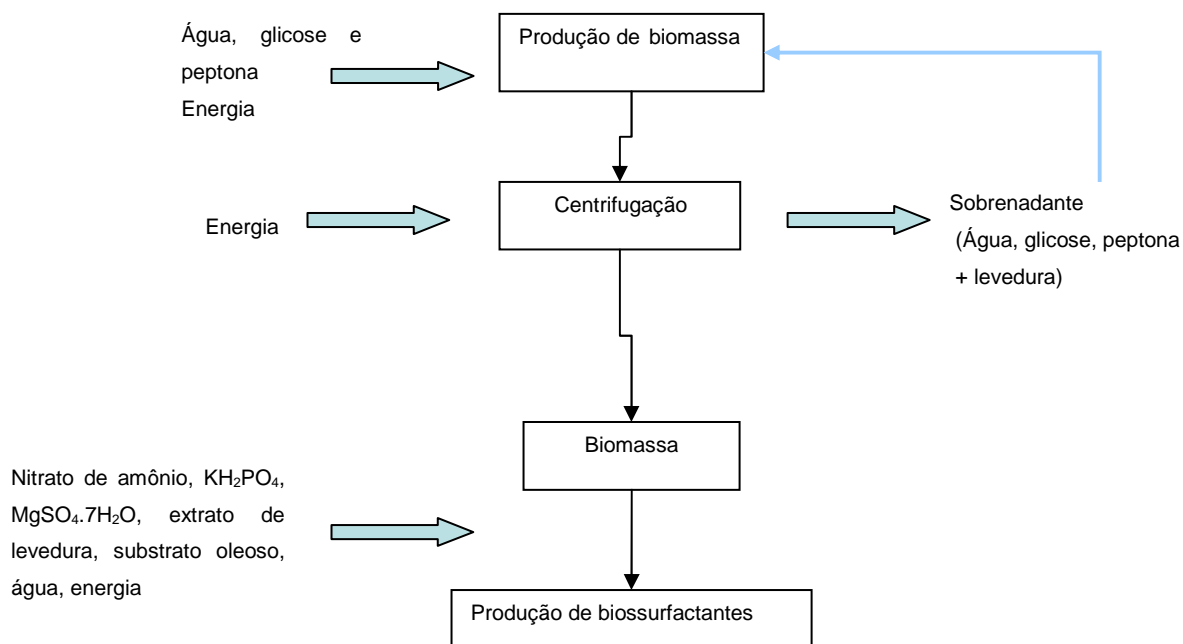


Figura 15 - Diagrama de produção de biossurfactante não purificado.

A purificação do biossurfactante não foi realizada neste trabalho o que ainda envolveria a inserção de mais uma etapa de precipitação. A purificação de biossurfactante conforme realizada por Bueno et al. (2010) envolve a adição de etanol e consequente precipitação do biossurfactante.

Nesta etapa o uso de etanol é importante porque é um álcool de fonte renovável e o método é simples, exigindo consumo de energia para a centrifugação e separação do produto.

### 3.6.3 Matriz de interação de Leopold

Como o processo de produção possui uma sequência para ser executado, adotaram-se as etapas de produção para melhor identificar as atividades impactantes e montou-se a matriz de Leopold (Tabela 8) para observar a matriz

de Identificação qualitativa dos impactos ambientais da utilização da biomassa de *A. pullulans* para a produção de pululano.

Na Tabela 8 podemos observar no eixo horizontal as características ambientais relativas ao meio Físico, Biótico e Antrópico enquanto que, no eixo vertical podem ser percebidas as etapas do processo e as respectivas atividades impactantes.

Na Matriz de Interação, das 144 possíveis relações de impacto, 63 foram identificadas e organizadas nos gráficos da Figura 16, conforme classificação. Destes, 43% estão relacionados ao ganho econômico da comercialização de matéria - prima e produtos secundários ao processo, e 57% estão relacionados à possibilidade de acidentes no processo de purificação com conseqüente contaminação de água, solo e ar, bem como, relacionados ao uso de energia, água e nutrientes para o crescimento microbiano. Conforme Kaercher (2009), o emprego de etanol no processo é menos impactante que o emprego de metanol, conforme observado na análise da Matriz de Leopold para produção de biodiesel.

**TABELA 8 -** Matriz de identificação qualitativa de impactos ambientais da produção de biomassa de *Aureobasidium pullulans* e purificação do pululano.

<b>CARACTERÍSTICAS AMBIENTAIS RELEVANTES</b>										
Etapas	Atividades Impactantes	Meio Físico				Meio Biótico	Meio Antrópico			
		Ar		Recurso Hídrico	Recurso Edáfico	Flora/Fauna	Econômico Local	Qualidade de Vida	Desenvolvimento Regional	Qualid. Prod. Final
		Partículas Solidas	Gases e Vapores	Contaminação	Contaminação do Solo	Diminuição da Diversidade				
crescimento microbiano	adição de nutrientes	NDLCTV					PDRCTV	NIECTV	PDRCTV	PDLCVAV
	manutenção da temperatura e agitação							NIECTV		PDLCVAV
	adição de água							NIECTV		PDLCVAV
purificação	centrifugação							NIECTV		PDLCVAV
	separação de biomassa						PDRCTV	PIRCTV	PDRCTV	PDLCVAV
	aquecimento							NIECTV		PDLCVAV
	centrifugação							NIECTV		PDLCVAV
	separação de proteínas						PDRCTV	PIRCTV	PDRCTV	PDLCVAV
	evaporação							NIECTV		PDLCVAV
	adição de etanol		NDLCTV	NDLCTV	NDLCTV	NILCTV	PDRCTV	NIECTV	PDRCTV	PDLCVAV
	remoção de sobrenadante		NDLCTV	NDLCTV	NDLCTV	NILCTV		NIECTV		PDLCVAV
	lavagem com etanol		NDLCTV	NDLCTV	NDLCTV	NILCTV	PDRCTV	NIECTV		PDLCVAV
	remoção de sobrenadante		NDLCTV	NDLCTV	NDLCTV	NILCTV		NIECTV		PDLCVAV
	centrifugação							NIECTV		PDLCVAV
	remoção de sobrenadante		NDLCTV	NDLCTV	NDLCTV	NILCTV		NIECTV		PDLCVAV
secagem		NDLCTV					NIECTV		PDLCVAV	

**LEGENDA:** P - positivo; N - negativo; D - direto; I - indireto; L - local; R - regional; E - estratégico; C - curto prazo; M - médio prazo; O - longo prazo; T - temporário; Y - cíclico; A - permanente; V - reversível; S - irreversível.

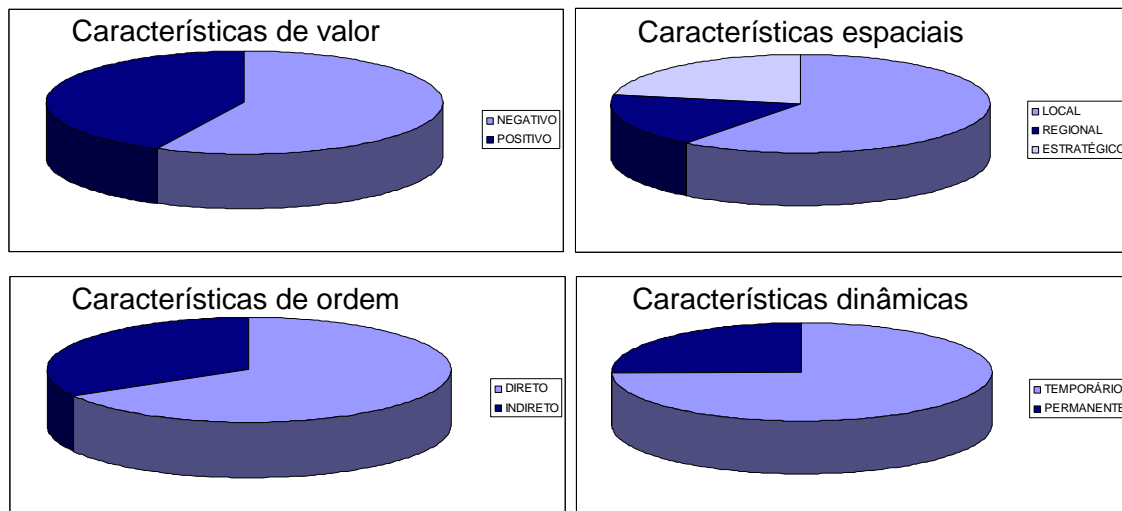


Figura 16 - Representação gráfica dos impactos identificados durante a produção de pululano.

Considerando que os impactos negativos foram quantificados em relação aos gastos com água e energia e a possíveis problemas como derramamento de materiais contaminantes, poderíamos dizer que se esses impactos forem minimizados, a maioria deles será positiva. Observa-se, também, que os impactos encontrados são principalmente locais, diretos e temporários e, além disso, todos são de curto prazo e reversíveis.

Estudo semelhante foi realizado a partir da produção de biossurfactante como mostra a Tabela 9, no entanto, com menos etapas do processo produtivo, considerando que a separação se dá por precipitação.

**TABELA 9 -** Matriz de identificação qualitativa de impactos ambientais da produção de biossurfactante com o emprego de *Aureobasidium pullulans*.

<b>CARACTERÍSTICAS AMBIENTAIS RELEVANTES</b>						
<b>Etapas</b>	<b>Atividades Impactantes</b>	<b>Meio Físico</b>	<b>Meio Antrópico</b>			
		Ar	<b>Económico Local</b>	<b>Qualidade de Vida</b>	<b>Desenvolvimento Regional</b>	<b>Qualid. Prod. Final</b>
		<b>Partículas Solidas</b>				
produção de biossurfactantes	adição de nutrientes	NDLCTV	PDRCTV	NIECTV	PDRCTV	PDLCAV
	manutenção da temperatura e agitação			NIECTV		PDLCAV
	adição de água			NIECTV		PDLCAV
purificação	adição de etanol		PDRCTV		PDRCTV	PDLCAV
	centrifugação		NDRCTV	NDRCTV		PDLCAV
<b>LEGENDA:</b> P - positivo; N - negativo; D - direto; I - indireto; L - local; R - regional; E - estratégico; C - curto prazo; M - médio prazo; O - longo prazo; T - temporário; Y - cíclico; A - permanente; V - reversível; S - irreversível.						

O registro dos impactos da Tabela 9 permitiu identificar e quantificar (Figura 17) que a produção de biossurfactantes apresenta-se, da mesma forma que identificado para a produção do pululano, como uma alternativa para contribuir para o desenvolvimento regional, uma vez que os impactos positivos estão relacionados à contribuição para a economia da região.

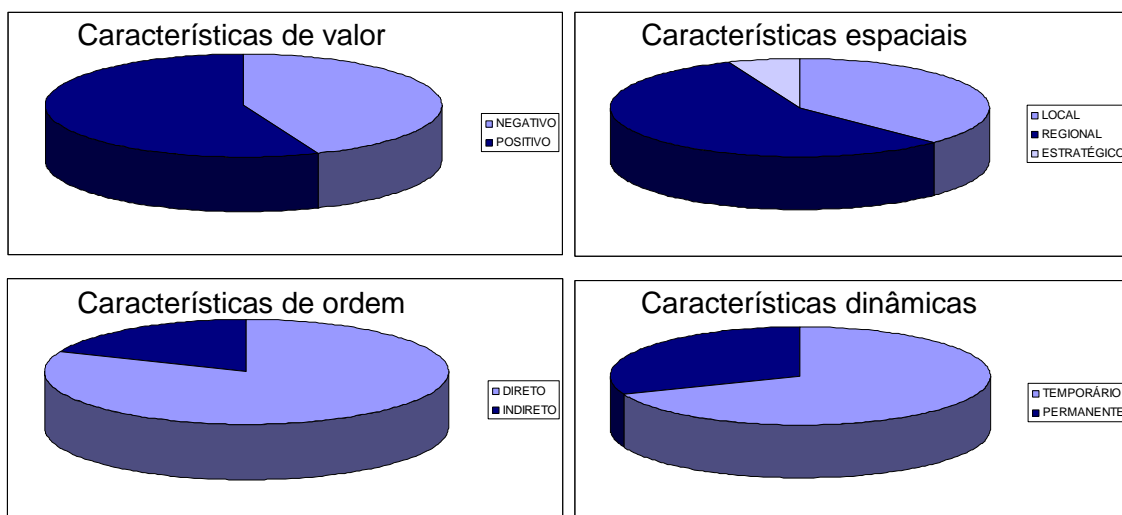


Figura 17 - Representação gráfica dos impactos identificados na produção de biossurfactante.

Os resultados encontrados mostram que, para os dois produtos analisados, pululano e biossurfactantes, a produção se deu com um número baixo de impactos identificados, pois o processo biotecnológico, não gera tantos impactos negativos. Nestes processos há emprego de matéria prima renovável, baixa emissão atmosférica, reuso da água, temperaturas suaves e baseiam-se em etapas de crescimento microbiano e operações de separação.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram isolados, do filoplano de *Ricinus communis*, fungos semelhantes a leveduras, caracterizados como *Aureobasidium pullulans*, que foram utilizadas em vários ensaios, visando o aproveitamento de derivados da oleoquímica, como o glicerol e o biodiesel, para a produção de biossurfactantes e do exopolissacarídeo pululano.

Quanto à produção de lipase, os resultados foram positivos, pois a levedura demonstrou atividade lipase, embora não tenha sido possível ainda, a sua aplicação como biocatalisador na produção de biodiesel.

As cepas de *A. pullulans*, mostraram capacidade de secreção de exopolissacarídeos como o pululano, sendo que houve diferença na quantidade produzida, de acordo com as fontes de carbono utilizadas, com a sacarose a produção foi maior do que com o glicerol.

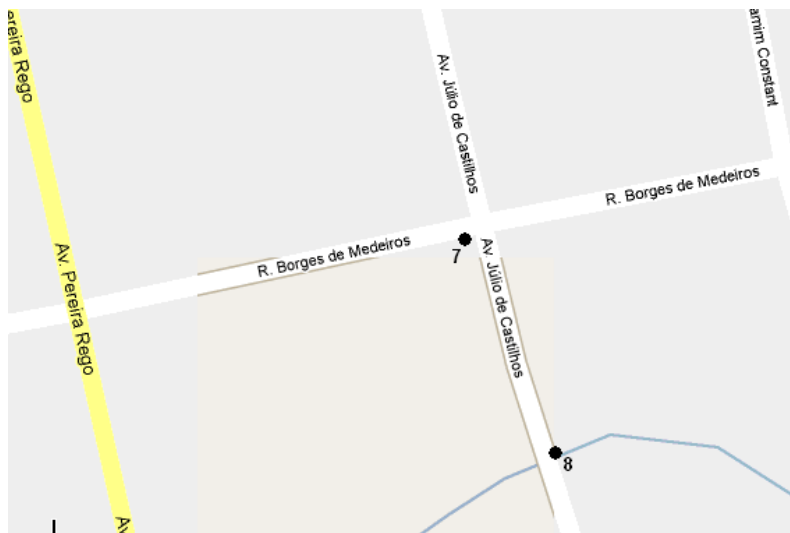
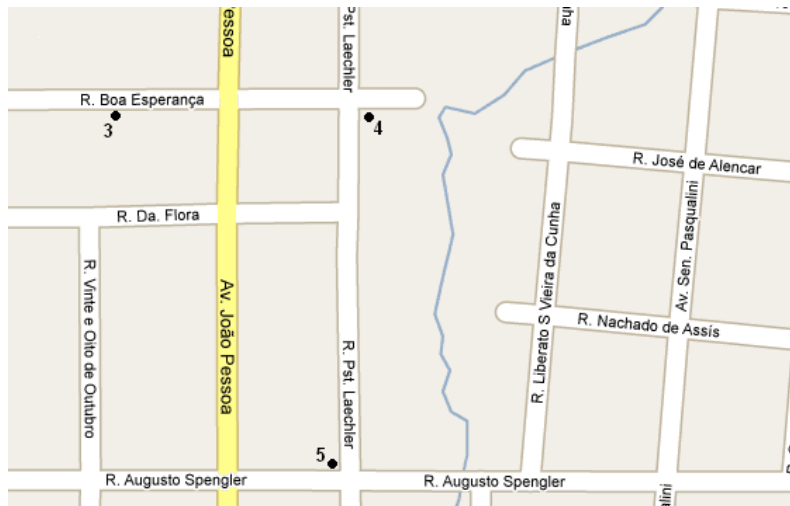
Na produção de biossurfactante com a levedura, foram utilizados dois indutores hidrofóbicos, o biodiesel e a querosene no primeiro ensaio e, ambos produziram biossurfactantes. O biossurfactante produzido, apresentou capacidade emulsificante, mostrada pelos valores do índice de emulsificação, que foi em torno de 60%. Deste modo, outras pesquisas empregando o biossurfactante produzido pela levedura *A. pullulans*, em processos de biorremediação, podem verificar a aplicabilidade deste produto, podendo ser usada para biorremediação de ambientes contaminados com poluentes orgânicos, como hidrocarbonetos provenientes da indústria petrolífera. Já no segundo ensaio, além destes indutores, foram testados a glicose, e o glicerol, cujos resultados foram diferentes, embora tenham comprovado a capacidade de produção de biossurfactantes.

Através da utilização da matriz de interação de Leopold, foi possível visualizar as atividades impactantes, relacionando-as aos meios: físico, antrópico e biótico, buscando assim uma otimização dos processos, de acordo com a Produção Mais Limpa.

Com isso, é possível comprovar a importância da seleção de microrganismos do ambiente, capazes de produzir biomoléculas, para o desenvolvimento de processos biotecnológicos.



# ANEXO A –



**ANEXO B -**



1



2



4



7



8

## REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, D.; SINHA, S.; AGARWALB, A. K. Experimental investigation of control of NO<sub>x</sub> emissions in biodiesel-fueled compression ignition engine. *Renewable Energy*, 31 (2006) 2356–2369.
- ALONSO, D. M. et al. Potassium leaching during triglyceride transesterification using K/c-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalysts. *Catalysis Communications*, 8 (2007) 2080–2086.
- ANISZEWSKI, E. et al. Bioemulsifier production by *Microbacterium* sp. strains isolated from mangrove and their application to remove cadmiun and zinc from hazardous industrial residue. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41 (2010) 235-245.
- BARBOSA, M. M. C.; PAZ, M. C. F. Produção de biossurfactantes por *Chromobacterium violaceum* utilizando como substrato óleo vegetal (óleo de pequi). *II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica*, João Pessoa - PB (2007).
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28 (2008) 979-985.
- BORZANI, W. et al. Biotecnologia na produção de alimentos. *Biotecnologia Industrial*, 4 (2001) 451-452.
- BRADSHAW, G. B.; MEULY, W. C. Preparation of detergents. *US Patent* 2, (1944) 360-844.
- BRASIL. ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) Resolução ANP N° 7 de 19 março de 2008. *Diário Oficial da União de 20 de março de 2008*.

- CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*, 26 (2003) 75-80.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. M.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, 27 (2004) 146-156.
- Centro Nacional de Tecnologias Limpas SENAI – RS/UNIDO /UNEP, Implementação de Programas de Produção mais Limpa – Porto Alegre 2003.
- CERTIK, M.; BREIEROVA, E.; JURSIKOVA, P. Effect of cadmium on lipid composition of *Aureobasidium pullulans* grown with added extracellular polysaccharides. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 55 (2005) 195–202.
- CLARK, S.J. et al. Methyl and ethyl soybean esters as renewable fuels for diesel engines. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61 (1984) 1632-1638.
- CORRÊA, S. M.; ARBILLAB, G.; Carbonyl emissions in diesel and biodiesel exhaust. *Atmospheric Environment*, 42 (2008) 769–775.
- COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. *Química Nova*, 23 (2000) 531.
- CHI, Z.; WANG, F.; CHI, Z.; YUE, L.; LIU, G; ZHANG, T. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82 (2009) 793–804.

CUNHA, R. T. Aplicação de enzimas em processos industriais têxteis. Rio de Janeiro, p. 122. Monografia, Curso de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, UFRJ, (1999).

FEUGE, F. O.; GROSE, T. Modification of vegetable oils. VII. Alkali Catalyzed Interesterification of Peanut oil with ethanol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 26 (1949) 97- 102.

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

FREEDMAN B.; PRYDE E.H.; MOUNTS T.L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetables oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63 (1986) 1375-1380.

FUENTEFRÍA, A. M. Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isoladas do filopano de *Hibiscus rosa-simensis*. 2004. 122f . Dissertação (Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Mestrado) - UFRGS, Porto Alegre (2004).

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92 (2001) 405-416.

GARCIA, C. M. et al. Transesterification of soybean oil catalyzed by sulfated zirconia. *Bioresource Technology*, 99 (2008) 6608-6613.

- GERMIDA, J. J; FRICK C. M; FARREL, R. E. Phytoremediation of oil – contaminated soils. *Developments in Soil Science*, 28B (2002) 169-186.
- GITLESEN, T. et al. Adsorption of lipase on polypropylene powder. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1345 (1997) 188–196.
- GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. Microbial Polysaccharides and Polyesters. *Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology*. New York : W. H. Freeman, (1995) 265-272.
- GRANADOS, M. L. et al. Biodiesel from sunflower oil by using activated calcium oxide. *Applied Catalysis B: Environmental*, 73 (2007) 317–326.
- GUTIÉRREZ, A.; PIETRO, A.; MARTÍNEZ, A. T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. *Carbohydrate Research*, 281 (1996) 143-154.
- HERNANDO, J. et al. Biodiesel and FAME synthesis assisted by microwaves: homogeneous batch and flow processes. *Fuel*, 86 (2007) 1641–1644.
- HUO, H. et al. Life-cycle assessment of energy use and greenhouse gas emissions of soybean-derived biodiesel and renewable fuels. *Environmental Science & Technology*, 1 (2009) 750-756.
- ISO, M. et al. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 16 (2001) 53-58.
- KAERCHER, J. A. Produção de biodiesel em escala piloto e avaliação dos impactos ambientais. 2009. 69 f. Dissertação (Programa de Pós-graduação

em Tecnologia Ambiental – Mestrado) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, (2009).

- KUROSAWA, T.; SAKAI, K., NAKAHARA, T., OSHIMA, Y., TABUCHI, T. Extracellular accumulation of the polyol lipids, 3,5-dihydroxydecanoyl and 5-hydroxy-2-decenoyl esters of arabitol and mannitol, by *Aureobasidium* sp. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58 (1994) 2057-2060.
- LANDELL, M. F.; MAUTONE, J. N.; VALENTE, P. Perfil enzimático de leveduras e fungos semelhantes a leveduras associados a bromélias da Praia da Pedreira, Parque de Itapuã – RS. *Revista Tecno-Lógica*, 9 (2005) 55-67.
- LEATHERS, T. D. e GUPTA, S. C. Production of pullulan from fuel ethanol byproducts by *Aureobasidium* sp. Strains NRRL Y-12,974. *Biotechnology Letters*, 16 (1994) 1163-1166.
- LEOPOLD, L. B et al. A procedure for evaluating environmental impact Washington, D.C. *Geological Survey Circular* (1971) 645 p.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Tecnologia das Fermentações. *Biotecnologia Industrial*, 1 (1992) 101-106.
- LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Processos fermentativos e enzimáticos. *Biotecnologia Industrial*, 3 (2001) 540 p.
- LIU, Z.; LI, X.; CHI, Z.; WANG, L.; LI, J; WANG, X. Cloning characterization and expression of the extracellular lipase gene from *Aureobasidium pullulans* HN2-3 isolated from sea saltern. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 94 (2008) 245-255.

- LIU, Z.; WANG, L.; CHI, Z.; LI, J. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. *Biochemical Engineering Journal*, 40 (2008) 445–451.
- MACHADO, M. A. de C. F., BETTIOL, W. Potencial para o biocontrole de *Botrytis cinerea* por leveduras em sistema integrado de cultivo de lírio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45 (2010) 539-545.
- MARTÍN, E. H.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym 435 and Lipozyme TL IM. *Bioresource Technology*, 99 (2008) 277–286.
- MCGRATH, M. J. e ANDREWS, J. H. Temporal changes in microscale colonization of the phylloplane by *Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (2006) 6234-6241.
- MENONCIN, S. et al. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29 (2) (2009) 440-443.
- MEESTERS, P. A. E. P., HUIJBWERTS, G. N. M., EGGINK, G. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45 (1996) 575-579.
- MORITA, T. et al. Microbial Conversion of Glycerol into Glycolipid Biosurfactants, Mannosylerythritol Lipids, by a Basidiomycete Yeast, *Pseudozyma antarctica*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104 (2007) 78-81.



- MOTA, S. Introdução à Engenharia Ambiental. Rio de Janeiro: ABES - 3 ed. (2003) 416 p.
- MUTHUSAMY, K. et al. Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Current Science*, 94 (2008) 736-747.
- NATURDATA, *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud (1918) <http://naturdata.com/Aureobasidium-pullulans-38082.htm>, acessado em 21/09/2010.
- NITSCHKE, M.; PASTORE G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*, 25 (2002) 772-776.
- PARAWIRA, W. The status and trends in food, industrial and environmental biotechnology research in Zimbabwe. *African Journal of Biotechnology*, 7 (2008) 1377-1384.
- RIVALDI, J. D.; SARROUH, B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S. Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, 37 (2007) 44-51.
- ROEHRS, G. Adsorção seletiva de lipase PS AMANO e de lipase de *Aspergillus niger* USP 898 em polipropileno poroso. 2009. 46 f. Monografia (Curso de Química Industrial) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, (2009).
- ROPKINS, K. et al. Real-world comparison of probe vehicle emissions and fuel consumption using diesel and 5% biodiesel (B5) blend. *Science of the Total Environment*, 376 (2007) 267–28.

ROSSI, M. et al. Greening the construction industry: enhancing the performance of cements by adding bioglycerol. *ChemSusChem*, 1(10) (2008) 809-812.

ROUKAS, T. e LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Production of pullulan from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank fermentor. *Journal of Food Engineering*, 40 (1999) 89-94.

SALIS, A. et al. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. *Journal of Biotechnology* 119 (2005) 291–299.

SEVIOUR, R. J. et al. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12 (1992) 279-298.

SCHNEIDER, R. de C. S. Oleoquímica: produção, extração, caracterização e transformação de óleos vegetais com ênfase na obtenção de biodiesel e aproveitamento de subprodutos.

[www.unisc.br/portal/upload/com.../semente\\_combustivel.pdf](http://www.unisc.br/portal/upload/com.../semente_combustivel.pdf), acessado em 19/10/2010.

SIDHU, S.; GRAHAM, J.; STRIEBICH, R.; Semi-volatile and particulate emissions from the combustion of alternative diesel fuels. *Chemosphere*, 42 (2001) 681-690.

SILVA, E. Apostila do Curso de Engenharia Florestal 685 - Análise e Avaliação de Impactos Ambientais. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa-MG (1996) 68 p.

USA. National Biodiesel Board, Nov. 2008. ASTM D6751-08.

VIEIRA, R. B.; LIMA, C. J. B.; FRANÇA, F. P.; SERVULO, E. F. C; CARDOSO, V. L. Estudo da produção de biossurfactante empregando culturas de

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e PALR. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica - UNICAMP (2005).

WU, S.; JIN, Z.; KIM, J. M.; TONG, Q.; CHEN, H. Downstream processing of pullulan from fermentation broth. *Carbohydrate Polymers*, 77 (2009) 750-753.

YKEMA A., VERBREE E. C., VERWOERT I. I. G. S., LINSDEN K. H van der, NIJKAMP H. J. J., SMIT H. Lipid production of revertants of Ufa mutants from the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33 (1990) 176-182.

YOUSSEF, F.; ROUKAS, T.; BILIADERIS, C. G. Pullulan production by a non-pigmented strain of *Aureobasidium pullulans* using batch and fed-batch culture. *Process Biochemistry*, 34 (1999) 355–366.

YURLOVA, N. A.; HOOG, G. S. A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. *Antonie van Leeuwenhoek*, 72 (1997) 141-147.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)