



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

CULTIVO DE MICROALGAS PARA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES

Eng^a. ELISÂNGELA MARTHA RADMANN

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa
Orientador

Prof. Dr. Mario R. Tredici
Co-orientador

RIO GRANDE, RS
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

CULTIVO DE MICROALGAS PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

Eng^a. ELISÂNGELA MARTHA RADMANN

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande como requisito para obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa
Orientador

Prof. Dr. Mario R. Tredici
Co-orientador

RIO GRANDE, RS
2011

*O Senhor é meu pastor, nada me faltará.
Em verdes prados ele me faz repousar.
Conduz-me junto às águas refrescantes, restaura as forças de minha alma.
Pelos caminhos retos ele me leva, por amor do seu nome.
Ainda que eu atravessasse o vale escuro, nada temerei, pois estais comigo.
Vosso bordão e vosso báculo são o meu amparo.
Preparais para mim a mesa à vista de meus inimigos.
Derramais o perfume sobre minha cabeça, e transborda minha taça.
A vossa bondade e misericórdia hão de seguir-me por todos os dias de minha vida.
E habitarei na casa do Senhor por longos dias.*

(Salmo 22- Oração que sempre rezo com muito carinho e que sempre me fez seguir em frente)

À minha mãe, irmãos e afilhadas dedico.

AGRADECIMENTOS

À DEUS que sempre me deu forças e me guiou. Obrigada por tudo que tenho e que sou!

Este trabalho foi realizado parte no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), com apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) sob orientação do PROF. DR. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA a quem agradeço muito por me orientar há 10 anos. Pelos valiosos ensinamentos acadêmicos e profissionais, que pela sua dedicação e amor à Ciência fez de mim uma profissional e um ser humano melhor.

A outra parte desta tese foi realizada na Università degli Studi di Firenze (UniFI) na Itália junto à Equipe do meu co-orientador PROF. DR. MARIO TREDICI (Equipe: Natascia Biondi, Liliana Rodolfi, Graziella Chini Zitelli, Alessia Guccione, Giulia Cheloni, Giulia Benvenuti, Giulia Macri, Giulia Padovani, Marzia Rosso, Silvia Venturini, Niccollò Bassi, Giacomo, Silvia Corsi e Tomazzo) a quem também agradeço com muito carinho, pela grande acolhida no desenvolvimento do trabalho e também pelo carinho e muitas amizades adquiridas. Um agradecimento especial à Dra. NATASCIA BIONDI pela disposição em me orientar, pela compreensão, carinho e amizade. Esta parte do trabalho também teve apoio financeiro do CNPq.

À banca examinadora Prof. Dra. Helen Treichel, Prof. Dra. Marli Camassola, Prof. Dr. Danilo Giroldo, Profa. Dra. Vilásia Guimarães Martins, Profa. Dra. Michele da Rosa Andrade, Profa. Dra. Michele Greque de Moraes, pelas correções e todas as sugestões e críticas que em muito contribuíram para o engrandecimento desta tese.

Às bolsista Fernanda Demoliner, Cibele Oliveira, Tiago Trindade, Kellen Zanfonato e Wendel Desordi pela grande ajuda em parte do trabalho.

À minha MÃE Maria Eliane Radmann, a quem devo tudo o que sou, pelo amor incondicional, exemplo de vida, dedicação, respeito e compreensão. Mãe querida, da qual tenho muito orgulho e agradeço sempre a Deus. Aos meus IRMÃOS e AMIGOS Carla e William Radmann, e minha AMADA Luiza Radmann da Fonseca, pelos momentos mais alegres de minha vida, pelo companheirismo, paciência e tolerância, e principalmente pelo imenso amor que há entre nós. “Não imaginei que fosse doer tanto ficar longe de vocês.

Com a enorme distância senti o quanto vocês fazem falta na minha vida, ou melhor, vocês são a minha Vida!”.

À minha amada afilhada Jéssica Leal Pires, que apesar de morar longe, sempre esteve presente na minha vida.

Às minhas amigas Ana Priscila da Rosa, Ana Cláudia Margarites, Ellen Zepka, Lisiane Carvalho, Rafaela Isoldi, Sabrina de la Rocha, Suelen Souza, Michele Andrade, Michele Morais, Thaisa Santos e Vilásia Martins, por sempre apoiarem as minhas escolhas, pelo carinho, por escutarem mil vezes as mesmas “historinhas da Du”, pelos conselhos, pelos momentos de muita alegria e paz, por sempre estarem dispostas a me ajudar, pela compreensão nos momentos de ausência. Enfim, pelo grande afeto, muito obrigada!

Ao meu amigo Roque Lourenço Zílio por toda ajuda e pela carinhosa amizade.

A todos meus amigos e colegas do LEB que sempre estiveram presentes na minha vida, eu estando perto ou bem longe. Que fizeram me sentir uma pessoa muito amada. Que me proporcionaram momentos inexplicáveis de muita felicidade quando estava longe, me mandando cartinhas, presentes (até um saquinho de feijão), slides de Feliz Aniversário, afetos e muitas energias boas. Pelas paradinhas (de muitos minutos) para o café no LEB, pelos almoços coletivos, pelas festinhas, pelos *happy hours*, pelas jantinhas. Que sempre me ajudaram, quando precisava, até mesmo para ficar 4 horas segurando tubos no agitador Vortex (obrigada Lisi, Ana Cláudia, Aninha, Luiza, Etiele e Thaisa). Enfim, que de diversas formas me ajudaram a crescer como pessoa e profissional. Muito Obrigada!

À Professora Eliana Badiale Furlong por sua disponibilidade em ajudar, mandando artigos, métodos e esclarecendo dúvidas por email, quando estava na Itália.

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus apoios em distintos momentos e por suas presenças afetivas, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE QUADROS.....	XIII
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 INTRODUÇÃO.....	2
1.2 OBJETIVOS.....	4
1.2.1 <i>Objetivo geral</i>	4
1.2.2 <i>Objetivos específicos</i>	4
1.3 JUSTIFICATIVA.....	5
CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 MICROALGAS.....	8
2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO DE MICROALGAS.....	9
2.2.1 <i>Fatores físico-químicos no cultivo de microalgas</i>	9
2.2.2 <i>Carbono no cultivo de microalgas</i>	10
2.2.3 <i>Nitrogênio no cultivo de microalgas</i>	10
2.3 BIORREACTORES PARA O CULTIVO DE MICROALGAS	11
2.4 BIOSURFACTANTES	15
2.4.1 <i>Metabolismo de produção de biossurfactantes</i>	18
2.4.2 <i>Fatores que afetam a produção de biossurfactantes</i>	21
2.4.2.1 Fonte de macronutrientes	21
2.4.2.2 Fatores físico-químicos.....	23
2.4.3 <i>Técnicas de extração</i>	24
2.4.4 <i>Estimativa da atividade biossurfactante</i>	26
2.4.5 <i>Aplicações dos biossurfactantes</i>	26
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

CAPÍTULO IV – ARTIGOS	39
4 ARTIGOS.....	40
4.1 CULTIVO AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO DE MICROALGAS PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES	41
4.1.1 RESUMO	41
4.1.2 ABSTRACT.....	41
4.1.3 INTRODUÇÃO.....	42
4.1.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1.4.1 Cultivo mixotrófico da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB-18	43
4.1.4.2 Seleção de microalgas para produção de biossurfactantes	44
4.1.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
4.1.5.1 Cultivo mixotrófico da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB-18	46
4.1.5.2 Seleção de microalgas para produção de biossurfactantes	48
4.1.6 CONCLUSÕES.....	51
4.1.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
4.2 SELEÇÃO DE MICROALGAS PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES	57
4.2.1 RESUMO	57
4.2.2 ABSTRACT.....	57
4.2.3 INTRODUÇÃO.....	58
4.2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
4.2.4.1 Micro-organismos e condições de cultivo.....	59
4.2.4.2 Estudo da extração dos biossurfactantes das microalgas.....	59
4.2.4.3 Caracterização dos extratos	62
4.2.4.4 Estimativa da atividade biossurfactante	62
4.2.4.5 Seleção da microalga produtora de biossurfactante.....	64
4.2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
4.2.6 CONCLUSÕES.....	73
4.2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
4.3 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR MICROALGAS EM DIFERENTES FOTOBIOREACTORES	78
4.3.1 RESUMO	78
4.3.2 ABSTRACT.....	78

4.3.3	<i>INTRODUÇÃO</i>	79
4.3.4	<i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	80
4.3.4.1	Micro-organismos e condições de cultivo	80
4.3.4.2	Determinações analíticas	81
4.3.4.3	Estudo da extração do biossurfactantes das microalgas	81
4.3.4.4	Caracterização dos extratos	82
4.3.4.5	Estimativa da atividade biossurfactantes	82
4.3.5	<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	84
4.3.6	<i>CONCLUSÕES</i>	92
4.3.7	<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	93
4.4	CULTIVO OUTDOOR DA MICROALGA MARINHA <i>TETRASELMIS SUECICA</i> OR PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES	97
4.4.1	<i>RESUMO</i>	97
4.4.2	<i>ABSTRACT</i>	97
4.4.3	<i>INTRODUÇÃO</i>	99
4.4.4	<i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	100
4.4.4.1	Micro-organismo e condições de cultivo	100
4.4.4.2	Determinações analíticas	101
4.4.4.3	Análise de Amido	101
4.4.4.4	Caracterização da biomassa produzida	102
4.4.4.5	Caracterização dos extratos	102
4.4.4.6	Estimativa da atividade biossurfactantes	103
4.4.5	<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	105
4.4.6	<i>CONCLUSÕES</i>	112
4.4.7	<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	113
	CAPÍTULO V - CONCLUSÃO GERAL	117
5	CONCLUSÃO GERAL	118
6	SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS	119
	APÊNDICES	120
	APÊNDICE 1 - CURVAS DOS BIOSSURFACTANTESS SINTÉTICOS UTILIZADOS COMO PADRÕES	121
	APÊNDICE 2 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS BIOMASSAS MICROALGAIS E DOS EXTRATOS	123

APÊNDICE 3 - ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES DAS MICROALGAS	127
APÊNDICE 4 – FOTOS DAS CÉLULAS DAS MICROALGAS	128
ANEXOS	129
ANEXO 1 – MEIO ZARROUK	130
ANEXO 2 – MEIO BG-11	131
ANEXO 3 – MEIO F	132

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1 - Cultivo autotrófico e mixotrófico de microalgas para produção de biossurfactantes

Tabela 1 Concentração celular máxima (X_{max} , g.L ⁻¹) produtividade máxima (P_{max} , g.L ⁻¹ .d ⁻¹) e velocidade específica máxima (μ_{max} , d ⁻¹) de crescimento para os experimentos realizados.....	47
Tabela 2 Concentração celular máxima (X_{max} , g.L ⁻¹) produtividade máxima (P_{max} , g.L ⁻¹ .d ⁻¹), velocidade específica máxima (μ_{max} , d ⁻¹) de crescimento e tensão superficial mínima (TS_{min} , mN.m ⁻¹) para as microalgas <i>Synechococcus nidulans</i> (Sy), <i>C. minutissima</i> (CM), <i>C. vulgaris</i> (CV), <i>C. homosphaera</i> (CH) e <i>Spirulina</i> sp. (Sp)	50

ARTIGO 2 - Seleção de microalgas para produção de biossurfactantes

Tabela 1 Resultados de atividade emulsificante óleo/água (UE.g ⁻¹) para as microalgas <i>Nannochloropsis</i> F&M-M24 e <i>T. suecica</i> OR.....	65
Tabela 2 Resultados de atividade emulsificante óleo/água (UE.g ⁻¹) para as microalgas <i>Scenedesmus</i> sp. 3PAV3 e <i>Chlorella</i> sp. PROD1	66
Tabela 3 AE o/a (UE) dos emulsificantes sintéticos utilizados como padrão	67
Tabela 4 Prova de estabilidade das emulsões formadas da AE a/o para os extratos estudados, medida em número de dias.....	68
Tabela 5 Tensões superficiais (TS, mN.m ⁻¹) para as microalgas estudadas.....	72

ARTIGO 3 - Produção de biossurfactantes por microalgas em diferentes fotobiorreatores

Tabela 1 Resultados de AE óleo/água (UE.g ⁻¹) para as culturas de <i>Chlorella</i> AC controle (<i>Chlo</i> AC), <i>Chlorella</i> AC com limitação de N (<i>Chlo</i> AC -N), <i>Chlorella</i> GWP (<i>Chlo</i> GWP), <i>Scenedesmus</i> GWP (<i>Sc</i> GWP) e <i>Scenedesmus</i> Raceway (<i>SC</i> R) para análise realizada com óleo de soja	86
Tabela 2 Resultados de AE óleo/água (UE.g ⁻¹) para as culturas de <i>Chlorella</i> AC controle (<i>Chlo</i> AC), <i>Chlorella</i> AC com limitação de N (<i>Chlo</i> AC -N), <i>Chlorella</i> GWP (<i>Chlo</i> GWP),	

Scenedesmus GWP (Sc GWP) e Scenedesmus Raceway (SC R) para análise realizada com óleo de girassol	87
Tabela 3 Prova de estabilidade, medida em dia, das emulsões formadas da AE a/o para os extratos estudados	89
Tabela 4 Tensão superficial (TS, mN.m^{-1}) para as microalgas estudadas	91

ARTIGO 4 - Cultivo outdoor da microalga marinha *Tetraselmis suecica* OR para produção de biossurfactantes

Tabela 1 Concentração de biomassa (X, g.L^{-1}), produtividade volumétrica (P, $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), peso da célula (PC, pg), concentração de nitrogênio (XN, mg), concentração de fósforo (XP, mg) para os ensaios realizados com T. suecica OR (controle e com limitação de N)	107
Tabela 2 Resultados de AE óleo/água (UE.g^{-1}) para T. suecica OR e coeficiente de variação da análise.....	109
Tabela 4 Tensões superficiais (TS, mN.m^{-1}) e interfaciais (TI, mN.m^{-1}) para T. suecica OR111	

LISTA DE QUADROS**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Quadro 1 Aplicações comerciais e potencialidades das microalgas	14
Quadro 2 Biossurfactantes mais produzidos por micro-organismos	17

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 Colheita e secagem de <i>Arthospira platensis</i> do lago Kossorom (Chad, África) (de Abdulqader et al., 2000)	9
Figura 2 Fotobiorreatores para produção de microalgas (a) Annular Columns; (b) Green Wall Panel.....	12
Figura 3 Produção de microalgas em biorreatores abertos no Brasil (a) Produção de <i>Spirulina</i> para enriquecimento de merenda escolar; (b) Biofixação de CO ₂ de gases de combustão por microalgas.	13
Figura 4 Estrutura das emulsões: (a) A/O e (b) O/A	16
Figura 5 Metabolismo intermediário relacionado à síntese de precursores de biossurfactantes a partir da utilização de carboidratos como substratos. Enzimas chaves para o controle do fluxo de carbono: A. fosfofrutoquinase; B. Piruvato quinase; C. isocitrato desidrogenase; D. citrato liase (presentes apenas em leveduras oleaginosas e fungos). E: piruvato desidrogenase; F: piruvato carboxilase.	19
Figura 6 Metabolismo intermediário relacionado à síntese de precursores de biossurfactantes a partir da utilização de hidrocarbonetos como substratos. As enzimas chaves são: A. isocitrato liase; B. malato sintase; C. fosfoenolpiruvato carboxilase; D. frutose – 1,6 bifosfatase.....	20

ARTIGO 1 - Cultivo autotrófico e mixotrófico de microalgas para produção de biossurfactantes

Figura 1 Produção de biomassa por <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 cultivada em diferentes concentrações de glicose (a) e melaço (b)	46
Figura 2 Curva de crescimento para as microalgas <i>S. nidulans</i> (+), <i>C. minutissima</i> (□), <i>C. vulgaris</i> (▲), <i>C. homosphaera</i> (○), <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 (●): (a) cultivos com bicarbonato de sódio (16,8 g.L ⁻¹) e (b) cultivos com glicose (5 g.L ⁻¹).	48
Figura 3 Tensão superficial ao longo do tempo para microalgas <i>S. nidulans</i> (+), <i>C. minutissima</i> (□), <i>C. vulgaris</i> (▲), <i>C. homosphaera</i> (○), <i>Spirulina</i> sp. (●): (a) cultivos com bicarbonato de sódio (16,8 g.L ⁻¹) e (b) cultivos com glicose (5 g.L ⁻¹).....	50

ARTIGO 2 - Seleção de microalgas para produção de biossurfactantes

Figura 1 Fotobiorreatores para produção de microalgas (a) <i>Green Wall Panel</i> (GWP); (b) <i>Annular Column</i> de 90 L (AC 90); (c) <i>Annular Column</i> de 6 L (AC 6)	59
Figura 2 Representação esquemática do ensaio da atividade emulsificante	64
Figura 3 Correlação da AE o/a com os componentes químicos presentes nos extratos estudados para (a) <i>Nannochloropsis</i> sp. FM – M24; (b) <i>T. suecica</i> OR; (c) <i>Scenedesmus</i> sp. 3PAV3 e (d) <i>Chlorella</i> sp. PROD1	70

ARTIGO 3 - Produção de biossurfactantes por microalgas em diferentes fotobiorreatores

Figura 1 Fotobiorreatores para produção de microalgas (a) <i>Annular Column</i> de 6 L (AC 6); (b) <i>Green Wall Panel</i> (GWP); (c) <i>Raceway</i>	81
Figura 2 Representação esquemática do ensaio da atividade emulsificante	84
Figura 3 Curvas de crescimento para as culturas de <i>Chlorella</i> sp. PROD1 em diferentes fotobiorreatores e modo descontínuo	85
Figura 4 Curvas de crescimento para as culturas de <i>Scenedesmus</i> sp. 3PAV3 em diferentes fotobiorreatores modo semicontínuo: (a) GWP e (b) <i>Raceway</i>	85
Figura 5 Variação diurna de temperatura (a) e densidade de fluxo de fótons fotossintéticos - PPFd (b) para <i>Chlorella</i> sp. PROD1 em GWP	88
Figura 6 Correlação da AE o/a com os componentes químicos presentes nos extratos estudados para (a) <i>Chlorella</i> sp. PROD1 e (b) <i>Scenedesmus</i> sp. 3PAV3	90

ARTIGO 4 - Cultivo outdoor da microalga marinha *Tetraselmis suecica* OR para produção de biossurfactantes

Figura 1 Fotobiorreatores do tipo <i>Green Wall Panel</i>	101
Figura 2 Representação esquemática do ensaio da atividade emulsificante	104
Figura 3 Cultivo de <i>Tetraselmis suecica</i> OR: (a) t=0 e (b) t=15 d	105
Figura 4 Curvas de crescimento para os cultivos de <i>T. suecica</i> OR: cultura controle e cultura com limitação de N.....	106
Figura 5 Análise de amido final na cultura de <i>T. suecica</i> OR – cultura em GWP: (a) Controle (b) com limitação de N	108
Figura 6 Correlação da AE o/a com os componentes químicos presentes nos extratos estudados para <i>T. suecica</i> OR.....	110

RESUMO

Há uma crescente procura por alimentos mais saudáveis e seguros para atender uma população cada vez maior e mais exigente. Nos últimos anos o interesse por surfactantes de origem microbiana tem aumentado significativamente em decorrência de serem naturalmente biodegradáveis diminuindo assim o impacto ambiental. Uma grande variedade de microorganismos produz biossurfactantes, sendo que o tipo, a quantidade e a qualidade do biossurfactante são influenciados pelos constituintes do meio, tais como, fontes de carbono, nitrogênio e sais inorgânicos, além das condições de cultivo, como pH, temperatura, agitação e disponibilidade de oxigênio. Os biossurfactantes são metabólitos microbianos de superfície ativa que apresentam uma vasta aplicação no setor industrial. Os objetivos deste trabalho foram selecionar microalgas com potencial para produzir biossurfactantes e estudar a produção por microalgas em diferentes fotobiorreatores e condições nutricionais. O trabalho foi dividido em quatro etapas: 1) cultivo autotrófico e mixotrófico de microalgas para produção de biossurfactantes; 2) Seleção de microalgas para produção de biossurfactantes; 3) Produção de biossurfactantes por microalgas em diferentes fotobiorreatores e 4) Cultivo *outdoor* da microalga marinha *Tetraselmis suecica* OR para produção de biossurfactantes. Na primeira etapa *Spirulina* sp. LEB-18, *Synechococcus nidulans* LEB-25, *Chlorella vulgaris* LEB-106, *Chlorella minutissima* LEB-108 e *Chlorella homosphaera* foram cultivadas com glicose (cultivo mixotrófico). *Spirulina* sp. LEB-18 apresentou concentrações máximas de biomassa ($2,55 \text{ g.L}^{-1}$) quando foi utilizada 5 g.L^{-1} de glicose no meio de cultivo. A tensão superficial dos meios das microalgas foi reduzida de 70 para 43 mN.m^{-1} para as microalgas estudadas utilizando glicose como fonte de carbono. Resultados da segunda etapa mostraram que a microalga *Scenedesmus* sp. 3PAV3 apresentou valor de atividade emulsificante óleo em água (AE o/a) superior ($339,8 \text{ UE.g}^{-1}$) ao encontrado para as demais microalgas. Os menores valores de tensões superficiais variaram de 27,4 a $31,2 \text{ mN.m}^{-1}$. Na terceira etapa verificou-se que a microalga *Chlorella* sp. PROD1 apresentou valor de AE o/a semelhante ($258,2 \text{ UE g}^{-1}$) ao encontrado para o emulsificante comercial lecitina de soja ($257,0 \text{ UE g}^{-1}$) e ambas as microalgas estudadas alcançaram valores de tensões superficiais abaixo de 30 mN.m^{-1} . Na última etapa, *Tetraselmis suecica* OR cultivada em fotobiorreator do tipo *Green Wall Panel* apresentou menores valores de tensões superficiais para cultura com limitação de nitrogênio. Os resultados demonstraram a potencialidade das microalgas estudadas na produção de biossurfactantes, tanto pela redução da tensão superficial e interfacial, como pelo aumento da atividade emulsificante, confirmando uma possível aplicação como emulsificante, detergente, lubrificante, estabilizante, entre outras.

Palavras-chave: biossurfactantes, fotobiorreatores, limitação de nitrogênio, microalgas.

ABSTRACT

There is a growing demand for healthier foods and insurance to listen a growing population and more demanding. In recent years interest in surfactants of microbial origin has increased significantly due to being naturally biodegradable thus reducing environmental impact. A wide variety of microorganisms produce biosurfactants and the type, quantity and quality of biosurfactant are influenced by medium constituents such as carbon source, nitrogen source and inorganic salts, beyond growth conditions such as pH, temperature, agitation and oxygen availability. The biosurfactants are microbial metabolites active surface with can be used in wide industrial sectors. The objectives this work were to identify algae with potential to produce biosurfactant and study the production of microalgae in different photobioreactors and nutritional conditions. This work was divided into four stages: 1) autotrophic and mixotrophic microalgae cultivation for biosurfactant production, 2) selection of microalgae for biosurfactant production, 3) Production of biosurfactants by microalgae in different photobioreactors and 4) *outdoor* cultivation of microalgae *Tetraselmis suecica* OR for biosurfactant production. In the first stage *Spirulina* sp., *Synechococcus nidulans*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella minutissima* and *Chlorella homosphaera* were cultured with glucose (mixotrophic culture). *Spirulina* sp. showed maximum concentrations of biomass (2.55 gL^{-1}) was used when 5 gL^{-1} glucose medium. The surface tension reduction of the microalgae medium was 70 to 43 mNm^{-1} for the microalgae Studied, using glucose as carbon source. The results of the second stage was showed that the microalga *Scenedesmus* sp. 3PAV3 showed value of oil in water emulsion activity (EA o/a) higher (339.8 EU.g^{-1}) to that found for other microalgae. The lower values of surface tensions ranging from 27.4 to 31.2 mNm^{-1} . In the third step we verified the microalgae *Chlorella* sp. PROD1 showed the value of AE o/a similar (258.2 EU g^{-1}) to that found for the commercial emulsifier soy lecithin (257.0 EU g^{-1}) and both microalgae Studied reached values of surface tensions below 30 mNm^{-1} . In the last step, *Tetraselmis suecica* cultured in *Green Wall Panel* photobioreactor was showed lower surface tension for the culture with nitrogen limitation. The results demonstrated the potential of microalgae studied biosurfactant production, both by reducing surface and interfacial tension, and expansion of the emulsifying activity, confirming a possible application as an emulsifier, detergent, lubricant, stabilizer, among others.

Keywords: Biosurfactant, photobioreactors, nitrogen limitation, microalgae.

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL

1.1 INTRODUÇÃO

As microalgas são micro-organismos fotossintéticos presentes nos ambientes aquáticos, responsáveis por uma parcela substancial da produção de O₂ e fixação de CO₂ (ZASLAVSKAIA et al., 2001). Quando cultivadas em meios adequados, certas espécies de microalgas podem duplicar a sua biomassa diariamente, produzindo matéria seca com um teor protéico superior a 50% e alcançando produtividades de 30-50 g.m⁻².d⁻¹ em peso seco (GOLDMAN, 1980).

O cultivo de microalgas tem sido focado em novas técnicas de cultivo e sua utilização na alimentação humana e animal, cosméticos e fármacos, e para aplicações ambientais, carecendo estudos relacionados à produção de biossurfactantes.

Neste trabalho foi proposto estudar o cultivo de microalgas, visando à produção de biossurfactantes, já que as microalgas são grandes produtoras de compostos como glicolípidios, fosfolípidios e lipídios neutros (RODOLFI et al. 2009; CHAUTON et al., 2004; XUE et al., 2002; BIGOGNO et al., 2002; CEVC, 1993; KOSARIC, 1992; SZUHAJ, 1989; BOROWTZKA, 1988), que por sua vez podem ser classificados como biossurfactantes (DESAI e BANAT, 1997). Biossurfactantes são compostos anfipáticos contendo uma parte hidrofílica e uma porção hidrofóbica e, portanto, são capazes de exibir uma variedade de atividades de superfície que permitem a solubilização de substratos hidrofóbicos (DESAI e BANAT, 1997).

Os biossurfactantes naturais estão se tornando cada vez mais importantes na indústria alimentícia frente aos surfactantes sintéticos, para os quais a popularidade está diminuindo devido ao perigo potencial que representam à saúde humana (LUKONDEH et al., 2003). Industrialmente, o fator segurança é o mais restrito e requer que o biossurfactante seja biodegradável e não forme compostos tóxicos ao corpo humano e ao meio ambiente (LIMA, 1997). Sendo assim, uma grande vantagem de cultivar microalgas para produção de biossurfactantes é que muitas são GRAS (*generally recognized as safe*). Organismos com certificado GRAS não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, o que permite sua utilização para aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica (BARTH e GAILLARD, 1997).

A estimulação na microalga à produção de biossurfactantes pode ser conseguida com uso de diferentes fontes de carbono, nitrogênio e outros nutrientes. A produção de biossurfactantes também pode ser influenciada pelas condições de cultivo como pH, temperatura e agitação (BANAT, 2000). Associado a estes fatores, o tipo de reator e sua operação podem influenciar a produção deste composto e qualidade do produto final. Além da

avaliação das possibilidades e potencialidades destes cultivos, a viabilização da produção destes micro-organismos em larga escala é de fundamental importância, devendo-se para isto, a obtenção de parâmetros de processo que possam ser levados à escala industrial e sejam economicamente viáveis.

Observando estes aspectos, este trabalho foi concebido para a produção de biomassa rica em biossurfactantes, utilizando-se diferentes fontes de carbono (glicose e melão), limitação de nitrogênio no meio de cultivo e o uso de diferentes fotobiorreatores, estimulando assim a produção do bioproduto de interesse nas microalgas selecionadas.

O cultivo de microalgas é uma alternativa de desenvolvimento sustentável, e fica evidente a importância de ultrapassar os limites do laboratório de pesquisa e estudar seu cultivo em condições semelhantes às reais para a produção em grande escala, além de pesquisar novas fontes de nutrientes e fatores que aumentem a produtividade de biomassa de baixo custo e a produção de compostos bioativos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Estudar a produção de biossurfactantes pelas microalgas *Spirulina* sp. LEB-18, *Synechococcus nidulans* LEB-25, *Chlorella vulgaris* LEB-106, *Chlorella minutissima* LEB-108, *Chlorella homosphaera*, *Scenedesmus* sp. 3PAV3, *Chlorella* sp. PROD1 e *Tetraselmis suecica* OR.

1.2.2 Objetivos específicos

- Selecionar microalgas produtoras de biossurfactantes;
- Estudar diferentes fontes de carbono (bicarbonato de sódio, glicose, melão) na produção de biossurfactantes por microalgas;
- Cultivar microalgas em diferentes fotobiorreatores (*Green Wall Panel*, *Annular column* e *Raceway*) e condições nutricionais estimulando a produção de biossurfactantes;
- Estudar o processo de extração do biossurfactantes das microalgas quanto às variáveis solvente, tempo de extração, agitação e temperatura.

1.3 JUSTIFICATIVA

O estudo sobre a utilização de microalgas é recente e promissor, carecendo de estudos mais detalhados visando preencher lacunas de seu uso como inovador tecnológico e fornecedor de subprodutos e extratos provenientes das mesmas.

A Universidade Federal do Rio Grande (FURG) é um dos mais importantes centros de estudos multidisciplinares sobre ecossistemas costeiros do Brasil e América do Sul. Contribui, assim, com o conhecimento sobre este ambiente e suas inter-relações, respeitando o homem como peça chave dentro deste sistema e privilegiando-o com o conhecimento adquirido para promover a saúde e a qualidade de vida da população. Neste contexto, o Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, dedica-se ao desenvolvimento de tecnologias e produtos que agreguem valor e contribuam para o desenvolvimento sustentável da sociedade.

Esta tese pode ser justificada pela junção das duas linhas de pesquisa, cultivo de microalgas e produção de biossurfactantes, do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

Desde 1998, o LEB vem desenvolvendo pesquisas sobre a produção de biossurfactantes e sua utilização em biorremediação de hidrocarbonetos, demonstrando a sua preocupação com a utilização de resíduos agroindustriais e a redução de impactos ambientais (MARTINS et al., 2008; PINTO, 2008; CERQUEIRA, 2007; CASTIGLIONI, 2006; CAMERINI e CHANIN, 2005; COSTA, 2004; JUNIOR et al., 2003; SANTOS et al., 2001; GANDRA et al., 2000; LINDE, 2000; MORAES, 1999; HASAN, 1998; TREICHEL et al., 1998).

Pesquisas com microalgas no LEB vêm sendo realizadas desde 1996. Já foram estudados substratos alternativos para o crescimento (ANDRADE e COSTA, 2008; ANDRADE e COSTA, 2007; COSTA et al., 2003), configurações de fotobiorreatores e modos de cultivo (REICHERT et al., 2006; RADMANN, et al., 2007; COSTA et al., 2004), efeito de fatores como temperatura (COLLA et al., 2004), iluminância (ANDRADE e COSTA, 2007), taxa de renovação e concentração de corte (REINEHR et al., 2006) no crescimento e composição da biomassa de microalgas. Foram realizados estudos de custos de produção (COZZA, 1999), do potencial antitumoral (LOPES et al., 2005) e hipocolesterolêmico (COLLA et al., 2008) da microalga *Spirulina*, modelagem matemática do crescimento de *Spirulina* (COSTA et al., 2002; COSTA et al., 2000), perfil de ácidos graxos (MORAIS e COSTA; 2008; RADMANN et al., 2006) e o isolamento de uma cepa nativa do extremo sul do Brasil (MORAIS et al., 2008). Foram desenvolvidos produtos adicionados de biomassa microalgal para alimentação humana

(MORAIS et al., 2006) e ração. Biofixação de gás carbônico de gases de combustão (MORAIS et al., 2011; MORAIS e COSTA, 2008; RADMANN e COSTA, 2008) entre outros estudos. Também, já foram desenvolvidos mais de 15 alimentos com a adição da microalga *Spirulina*.

O Laboratório de Biotecnologia Agrária da Università degli Studi di Firenze (UniFI - Itália), coordenado pelo professor Mario Tredici, desde 1981 vem desenvolvendo trabalhos sobre microalgas. O grupo possui quatro patentes européias de desenvolvimento de fotobiorreatores para cultivo de micro-organismos fotossintéticos (TREDICI e RODOLFI, 2004; MATERASSI et al., 1995; TREDICI et al., 1993; TREDICI et al., 1990) e uma patente européia de cultivo da cianobactéria *Nostoc* para produção de biomassa, extratos e moléculas bioativas (PICCARD et al., 2000). Além disso, o grupo apresenta diversas publicações em periódicos e livros científicos acerca de condições de cultivo de microalgas e um *Spin-off Company* da UniFI (Fotosintetica & Microbiologica S.r.l.) fundado em 2004 pelo Prof. Mario Tredici e colaboradores.

Culturas de microalgas podem ajudar a reduzir problemas ambientais encontrados atualmente em nosso planeta. A eficiência de conversão de energia solar de culturas de microalgas em biomassa é muito maior que a obtida pelas plantas terrestres. Por exemplo, um hectare de girassol ou canola pode produzir 700-1000 kg de azeite por ano, enquanto culturas de microalgas, se realizados em fotobiorreatores, produzem até 20 ton de óleo por hectare por ano e em países tropicais podem produzir mais de 30 ton (RODOLFI et al., 2007). As culturas de microalgas não competem com culturas de terras férteis, pois não necessitam de agrotóxicos e podem ser realizadas na água do mar ou águas residuais, onde juntamente com bactérias, as microalgas reciclam nutrientes em biomassa a partir da qual pode-se obter alimentos protéicos e fertilizantes, bem como os biocombustíveis (TREDICI, 2006).

Através deste trabalho pretendeu-se estudar o cultivo de microalgas para obtenção de biossurfactantes. Os biossurfactantes apresentam vantagens quando comparados com os quimicamente sintetizados, pois são biodegradáveis, apresentam baixa toxicidade, são efetivos em uma ampla faixa de temperatura, pH e salinidade e podem ser sintetizados através do emprego de recursos renováveis (DESAI e BANAT, 1997). Considerando as propriedades dos biossurfactantes, torna-se possível a aplicação em diversos processos industriais como detergência, emulsificação, lubrificação, solubilização e dispersão de fases. Entretanto, os custos de produção de biossurfactantes tem limitado aplicações comerciais. Porém, custos podem ser reduzidos através da melhoria do rendimento e do uso de substratos baratos como glicose e melação. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, a partir da qual é gerado o melação como subproduto na indústria açucareira, que contém, em média, 50% de

açúcares em sua composição, o que lhe confere potencial para ser utilizado como substrato orgânico no cultivo de microalgas.

A fonte de carbono nos cultivos de microalgas representa um importante componente dos custos de produção, de modo que reduzir a quantidade de meio inorgânico sem perder em produtividade pode ser um artifício para reduzir custos de produção da microalga.

Os biossurfactantes são produzidos por uma ampla variedade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (COSTA et al., 2006; KARANTH et al., 1999). Não foram encontrados trabalhos na literatura de produção de biossurfactantes por microalgas, mas vários autores relatam a produção de compostos como glicolipídios, fosfolipídios, lipídios neutros, por microalgas (RODOLFI et al. 2009; CHAUTON et al., 2004; XUE et al., 2002; BIGOGNO et al., 2002; CEVC, 1993; KOSARIC, 1992; SZUHAI, 1989; BOROWTZKA, 1988), que podem ser classificados como biossurfactantes.

Na indústria de alimentos o uso de biossurfactantes é restrito, devido às questões de segurança, qualidade sensorial, custo, propriedades funcionais, hábitos e leis. O fator segurança é o mais restrito e requer que o biossurfactante seja biodegradável e não forme compostos tóxicos ao corpo humano e ao meio ambiente (LIMA, 1997). Uma das grandes vantagens de se cultivar microalgas para a produção de biossurfactantes, é que muitas não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, além de possuírem o certificado GRAS (*Generally Recognized as Safe*), o que permite sua aplicação em indústrias de alimentos e farmacêutica (BARTH e GAILLARD, 1997).

O desenvolvimento de processos biotecnológicos utilizando biomassa microalgal e suas infinitas aplicabilidades no campo biotecnológico fazem necessária a utilização de técnicas de extração eficientes, que auxiliem na obtenção de produtos com alto grau de pureza e conseqüentemente de melhor reprodutibilidade analítica.

O emprego de novas tecnologias de forma correta pode contribuir para a racionalização da cadeia de produção e para a oferta de produtos nutricionalmente adequados às necessidades da população, tendo em vista os complexos problemas sócio-econômicos e culturais do país.

CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microalgas

O cultivo de microalgas vem sendo cada vez mais difundido no mundo inteiro. Os primeiros estudos sobre microalgas em laboratório começaram no início do século passado. Cultivos massivos começaram em 1960 com *Chlorella* e *Scenedesmus*, no Japão, Alemanha e Estados Unidos. Na Itália, os estudos sobre cultivos massivos de microalgas iniciaram em 1956 no Instituto de Microbiologia Agrária e Técnica da Università degli Studi di Firenze com o Professor Gino Florenzano e foram formalizados em 1963 na Instituição do Centro de Estudos de Micro-organismos Autotróficos do CNR (Centro Nacional de Pesquisa) (TREDICI, 2006).

No Brasil, pesquisas com microalgas são relativamente recentes e têm focado, principalmente, o aspecto de crescimento sob diversas condições nutricionais e físico-químicas. No Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), cultivos massivos vêm sendo realizados desde o ano 2000, com a produção de *Spirulina* para enriquecimento de alimentos para a merenda escolar e no ano de 2007 começou, também, a funcionar a planta piloto de cultivo de microalgas para biofixação de CO₂, instalada na Usina Termelétrica Presidente Médici, operada pela Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica (CGTEE).

Uma das microalgas mais estudada no mundo é a *Spirulina* (Figura 1). Esta microalga se destaca por apresentar alto teor de proteínas (51 – 71%), ácidos graxos poliinsaturados, especialmente γ -linolênico, vitaminas, principalmente do complexo B e minerais. Esta microalga possui o certificado *Generally Recognized as Safe* (GRAS) da *Food and Drug Administration* (FDA) e no Brasil é reconhecida como alimento pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), podendo ser utilizada na alimentação sem oferecer risco à saúde. A microalga *Spirulina* ocorre naturalmente no extremo sul do Brasil (MORAIS et al., 2008).



Figura 1 Colheita e secagem de *Arthrospira platensis* do lago Kossorom (Chad, África) (de Abdulqader et al., 2000)

Culturas de microalgas consomem grandes quantidades de CO₂ (cerca de 2 kg de CO₂ por kg de biomassa de microalgas) e já demonstraram capacidade de fixação de CO₂ de gases de combustão (MORAIS et al., 2011; RADMANN e COSTA, 2008, TREDICI, 2006).

2.2 Condições de cultivo de microalgas

Como qualquer outro micro-organismo, as microalgas reagem a variações do meio exterior com alterações do seu meio intracelular. Desta maneira, a manipulação de condições de cultivo, nomeadamente a presença ou ausência de determinados nutrientes, estimula a biossíntese de compostos que vão desde enzimas a fármacos estimulantes da tiróide e antioxidantes naturais, alguns de elevado valor comercial. Este fato pela primeira vez referenciado por TAMIYA (1957), que modificou a composição, principalmente no seu teor em lipídios e proteínas, variando as condições de cultivo da microalga.

2.2.1 Fatores físico-químicos no cultivo de microalgas

A produtividade máxima só pode ser alcançada na temperatura ótima para o crescimento da microalga. Embora tanques abertos sejam limitados por temperaturas baixas pela manhã, fotobiorreatores geralmente necessitam de resfriamento ao meio-dia. A imersão em um banho de água, pulverização de água ou a utilização de trocadores de calor internos são as soluções mais comuns adotadas para controlar a temperatura no exterior dos fotobiorreatores. Pulverização de água pode ser confiável e de baixo custo em climas secos (TREDICI, 2004).

Outro fator importante em relação a produtividade das microalgas, é a luminosidade nos cultivos. Níveis extremos de iluminância no cultivo de microalgas podem conduzir a dois

fenômenos desfavoráveis ao crescimento. A fotoinibição ocorre quando o fluxo de fótons absorvido nos tilacóides provoca uma concentração de elétrons de alta energia na célula excessiva para ser consumida pelo Ciclo de Calvin. Estes elétrons de alta energia reagem com água e formam peróxido de hidrogênio, tóxico às células (CHOJNACKA e NOWORYTA, 2004).

VONSHAK e GUY (1992) foram os primeiros a demonstrar que as culturas de *Spirulina platensis* densas sofriam fotoinibição ao meio-dia (fotoinibição diurna) e verificaram redução na produtividade diária de aproximadamente 20%.

A fotolimitação é outro fenômeno desfavorável que ocorre devido ao sombreamento que as células da superfície causam nas camadas mais profundas do meio de cultivo (MOHANTY et al., 1997).

2.2.2 Carbono no cultivo de microalgas

A fonte de carbono é um dos principais componentes na produção de biomassa microalgal. A fonte de carbono utilizada no processo fotossintético das microalgas é o bicarbonato de sódio e/ou dióxido de carbono. Além disso, muitas microalgas podem crescer heterotroficamente durante o período escuro utilizando fontes orgânicas de carbono (WEN e CHEN, 2003). Quando as células são expostas à luz, muitas microalgas podem assimilar carbono inorgânico e orgânico simultaneamente, desenvolvendo metabolismo mixotrófico (POERSCHMANN et al., 2004).

Fontes alternativas de carbono têm sido estudadas, como CO₂ de combustão gerado em indústrias ou usinas termelétricas (BENEMANN, 1997; MAEDA et al., 1995; SAKAI et al., 1995), águas naturais alcalinas (COSTA et al., 2002), fontes orgânicas, como melaço (ANDRADE e COSTA, 2008; ANDRADE e COSTA, 2007) e resíduos da indústria açucareira (OLGUÍN et al., 1995).

2.2.3 Nitrogênio no cultivo de microalgas

Quando a limitação de nitrogênio é imposta à uma cultura exposta a iluminação adequada, a fotossíntese continua sendo realizada, embora a uma taxa reduzida, e o fluxo de carbono fixado é desviado à síntese de lipídios e carboidratos. Apesar do teor em carboidratos chegar acima de 70% da biomassa seca, sem redução na produtividade, o acúmulo de lipídios é frequentemente associado a uma redução na produtividade. Além disso, acredita-se geralmente que o aumento no teor de lipídios durante a limitação de nitrogênio, é devido principalmente a

perda de outros componentes, particularmente de proteínas. No entanto, há também indicações de que o conteúdo lipídico acumulado pela microalga, quando exposta a limitação de nitrogênio, se deve ao carbono fixado, e que, em microalgas (mais verdes), o acúmulo de lipídios em cultivos com limitação de nitrogênio pode resultar em maior quantidade de biomassa total no início do cultivo do que quando acontece o estresse das células (FOGG, 1965; SHIFRIN e CHISHOLM, 1981).

SPOEHR e MILNER (1949) demonstraram que a limitação de nitrogênio no cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* resultou no acúmulo de até 85% de lipídios em sua biomassa, enquanto que o conteúdo lipídico típico de culturas de microalgas foi apenas cerca de 5%.

A microalga marinha *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 foi cultivada com limitação de nitrogênio em confronto com cultivo controle, e apresentou 0,30 e 0,36 g.L⁻¹.d⁻¹ de produtividade e, 60% e 32 de lipídios, respectivamente (RODOLFI et al., 2009).

2.3 Biorreatores para o cultivo de microalgas

A produção comercial de microalgas é realizada predominantemente em biorreatores abertos do tipo *Raceway*. *Raceway* são usados na maioria das plantas comerciais para produção de biomassa de *Arthrospira*. Os principais produtores de *Arthrospira* concentram-se nos EUA, *Cyanotech* no Havaí e *Earthrise Farms* na Califórnia (com tanques de 75.000 e 150.000 m², respectivamente). *Raceway* também são utilizados para o cultivo massivo de *Dunaliella salina*, como na *Nature Beta Technologies Ltd* em Israel (TREDICI, 2004).

Há relatos na literatura de que fotobiorreatores fechados (FBRs) vão prevalecer no futuro, mesmo em grande escala. FBRs são sistemas flexíveis que podem ser otimizados em função das características da espécie cultivada e permitir cultivar microalgas que não podem ser cultivadas em tanques abertos por causa da contaminação.

Os FBRs são reatores designados especificamente para o cultivo de microorganismos fototróficos (bactéria anoxigênica fotossintética, cianobactéria, microalga) e células de plantas ou para realizar uma reação fotobiológica (TREDICI, 1999).

Nas últimas décadas FBRs tem evoluído com propostas de novos modelos. Têm-se duas configurações básicas, que são os fotobiorreatores de placa plana e os tubulares. O princípio fundamental destas configurações é reduzir a trajetória da luz de forma a aumentar a quantidade de luz disponível para cada célula da cultura. Estes biorreatores possuem uma adequada agitação para permitir uma disponibilização melhor da luz, bem como aumentar as

trocas gasosas. A espessura ótima de cultura nestes biorreatores está entre 0,02 e 0,04 m (BOROWITZKA, 1999).

No Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande foram estudados diferentes tipos de fotobiorreatores (Figura 3) no cultivo de microalgas (MORAIS et al., 2011; ROSA et al., 2011; MORAIS e COSTA, 2007; RADMANN et al., 2007; COSTA et al., 2006; ANDRADE, 2005; COLLA et al., 2004; REINEHR, 2003; COSTA et al., 2002; DUARTE FILHO, 2002; COSTA et al., 2001; SANTOS, 2001; COSTA et al., 2000; COZZA, 1999).

Neste trabalho foram utilizados FBRs do tipo *Annular columns* (Figura 2b), desenvolvidos no Departamento de Biotecnologia Agrária da Università degli Studi di Firenze (Itália) e já foram utilizados para produção e eficiência fotossintética de *Tetraselmis suecica* (CHINI ZITTELLI et al., 2006), para produção de *Nannochloropsis* (CHINI ZITTELLI et al., 2003; RODOLFI et al., 2003) e *Isochrysis* sp. T-ISO (CHINI ZITTELLI et al., 2004), entre outros.

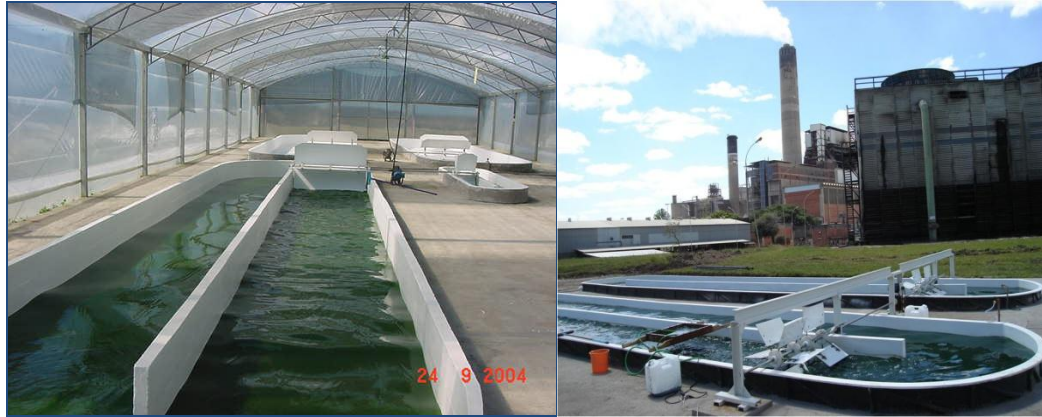
Também no presente trabalho foram utilizados os FBRs do tipo *Green Wall Panel* (GWP) (Figura 2a) desenvolvido por TREDICI e RODOLFI (2004) na empresa Fotosintetica & Microbiologica s.r.l. da Università degli Studi di Firenze (UniFI), Itália. Apresenta vantagens como baixo custo de produção, baixa contaminação, altas produtividades, etc. São bastante utilizados na produção de lipídios por *Nannochloropsis* (RODOLFI et al., 2009). Este fotobiorreator já é utilizado em vários países como Estados Unidos, Chile, Portugal e Itália.



(a)

(b)

Figura 2 Fotobiorreatores para produção de microalgas (a) Annular Columns; (b) Green Wall Panel. FONTE: Fotosintetica & Microbiologica s.r.l. – UniFI, Itália.



(a)

(b)

Figura 3 Produção de microalgas em biorreatores abertos no Brasil (a) Produção de *Spirulina* para enriquecimento de merenda escolar; (b) Biofixação de CO_2 de gases de combustão por microalgas. FONTE: Laboratório de Engenharia Bioquímica - FURG

O Quadro 1 apresenta o estado da arte da produção de microalgas, com suas diferentes aplicações comerciais e potencialidades.

Quadro 1 Aplicações comerciais e potencialidades de alguns micro-organismos

Produto ou processo	Espécie	Quantidade produzida por ano (ton)	Sistema de cultivo	Estado
Integrador alimentar, ração animal	<i>Arthrospira</i>	3000	Lagoa	Comercial
	<i>Chlorella</i>	2000	Tanques <i>Raceway</i>	
	<i>Dunaliella</i>	1200	Tanques circulares	
	<i>Aphanizomenon</i>	500	Fotobiorreatores	
	<i>Haematococcus</i>	300		
Pigmentos (carotenóides, ficobiliproteínas)	<i>Dunaliella</i>		Lagoa	Comercial
	<i>Arthrospira</i>		Tanques <i>Raceway</i>	
	<i>Haematococcus</i>		Fotobiorreatores	
Ácidos graxos ω 3 (DHA)	<i>Schyzochitrium</i>	10 ton de óleo	Fermentadores (10 – 100 m ³)	Comercial
	<i>Crypthecodinium</i>	240 ton de óleo		
Marcadores fluorescentes, moléculas marcadas, enzimas de restrição	<i>Arthrospira</i>		Fermentadores Fotobiorreatores axênicos	Comercial
	<i>Anabaena</i>			
	<i>Anacystis</i>			
Tratamento de águas residuárias (HRAP)	<i>Scenedesmus</i> Cultura mista		Lagoa Tanques <i>Raceway</i>	Comercial
Biomassa para aquacultura	Várias espécies		Tanques, sacos, cilindros, fotobiorreatores	Comercial
Polissacarídeos				Pesquisa
Biofertilizantes				Pesquisa
Moléculas bioativas (fármacos, biopesticidas, probióticos, etc)				Pesquisa
Biosensores e <i>sun-screens</i>				Pesquisa
Biorremediação de águas contaminadas por xenobióticos, metais pesados, etc.				Pesquisa
Biofixação de CO ₂				Pesquisa
Energia (Biodiesel, H ₂)				Pesquisa

FONTE: TREDICI, 2006.

2.4 Biossurfactantes

Biossurfactantes são compostos anfífilicos contendo uma parte hidrofílica e uma porção hidrofóbica e, portanto, são capazes de exibir uma variedade de atividades de superfície que permitem a solubilização de substratos hidrofóbicos (DESAI e BANAT, 1997). Os biossurfactantes estruturalmente apresentam combinações diversas, principalmente aqueles produzidos por micro-organismos na presença de hidrocarbonetos. Em sua grande maioria são lipídios, os quais apresentam uma estrutura típica de surfactante. A porção lipofílica dos lipídios normalmente é um hidrocarboneto com um ou mais ácidos graxos, os quais podem ser saturados, insaturados ou conter estruturas cíclicas. A porção polar do biossurfactante pode ser simples (carbonila, hidroxila) ou uma mistura complexa de fosfatos, carboidratos, aminoácidos, dentre outros (LANG, 2002).

O interesse pelos biossurfactantes microbianos aumentou durante a última década (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998), pois apresentam a capacidade de atuar na interface das células apresentando diferentes polaridades, em especial óleo/água, ar/água e agindo como agentes umectantes em superfícies sólidas (água/sólido). Esse processo dinâmico é baseado na habilidade dos biossurfactantes em reduzir a tensão superficial pelo remanejamento molecular, através do acúmulo na superfície de compostos insolúveis, influenciando as ligações de hidrogênio e outras interações hidrofóbicas e hidrofílicas, aumentando a área superficial destes, levando a um aumento da biodisponibilidade e conseqüente biodegradabilidade. Além disso, os biossurfactantes podem ser possíveis substitutos para os surfactantes sintéticos e apresentarem muitos potenciais de aplicações industriais e ambientais relacionadas com emulsificação, formação de espuma, detergência, dispersão e solubilização de compostos hidrofóbicos (DASTGHEIB et al., 2008).

Uma grande quantidade de compostos com propriedades tensoativas são sintetizados por organismos vivos, que vão desde saponinas (plantas), micro-organismos (glicolipídios), até humanos (sais biliares) (BOGNOLO, 1999). INOH et al. (2003) afirmam que estes compostos de superfície ativa podem ser produzidos por micro-organismos capazes de crescerem em substratos insolúveis em água, apresentando muitas atividades biológicas.

Os bioemulsificantes de alta massa molecular são mais efetivos para estabilizar emulsões o/a, enquanto que os de baixa massa molecular reduzem as tensões superficiais e interfaciais (ROSENBERG e RON, 1999). Biossurfactantes geralmente exibem capacidade emulsificante, mas nem todos bioemulsificantes reduzem a tensão superficial (KARANTH et al., 1999).

A formação da emulsão geralmente envolve a combinação de três a cinco componentes, tais como, tensoativo, fase aquosa, fase oleosa e, quando necessário, o co-tensoativo, sendo que a orientação para sistemas O/A ou A/O (Figura 4) é dependente das propriedades físico-químicas do tensoativo, traduzidas principalmente pelo seu equilíbrio hidrófilo/lipófilo (EHL). A principal característica do sistema é formar espontaneamente a fase interna por homogeneização suave dos componentes da amostra (OLIVEIRA et al., 2004).

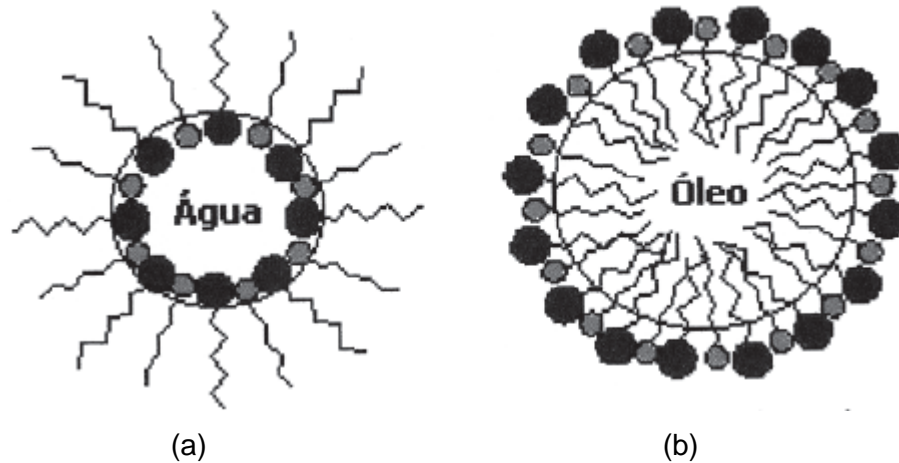


Figura 4 Estrutura das emulsões: (a) A/O e (b) O/A

FONTE: OLIVEIRA et al. (2004)

Os biossurfactantes são produzidos por uma ampla variedade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (COSTA et al., 2006; KARANTH et al., 1999), mas carece estudos relacionados à produção através de microalgas.

Quadro 2 Biossurfactantes mais produzidos por micro-organismos

Micro-organismo	Tipo de biossurfactantes
<i>Norcardia</i> SFC-D	Trealose
<i>Rhodococcus</i> sp. H13 A	Trealose
<i>Rhodococcus</i> sp. ST-5	Trealose
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GL-1	Ramnilipídio
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UW-1	Ramnilipídio
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GL-1	Ramnilipídio
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	Glicolipídio
<i>Tsukamurella</i> sp.	Glicolipídio
<i>Serratia rubidea</i>	Glicolipídio
<i>Serratia marcescens</i>	Glicolipídio
<i>Candida antarctica</i>	Mannosileritritol
<i>Candida bombicola</i>	Soforose
<i>Candida apicola</i> IMET 43747	Soforose
<i>Bacillus pumilus</i> A1	Surfactina
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactina
<i>Bacillus subtilis</i> C 9	Surfactina
<i>Bacillus licheniformis</i>	Lichenisin A
<i>Bacillus licheniformis</i> JF-2	Lichenisin B
<i>Arthrobacter</i> sp. EK1	Trealose tetraéster
<i>Arthrobacter</i> sp. MIS 38	Artrofactina
<i>Lactobacillus</i> sp.	Surfactina
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Viscosina
<i>Streptomyces tendae</i> TU901/8c	Streptofactina
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Alasan
<i>Pseudomonas marginalis</i> PD 14 B	Surfactante particulado
<i>Pseudomonas maltophilia</i> CSV 89	Biossurf Pm

FONTE: BANAT et al. (2000)

Na literatura não foram encontrados trabalhos de produção de biossurfactantes por microalgas, mas vários autores relatam a produção de compostos como glicolipídios,

fosfolipídios, lipídios neutros, por microalgas, que podem ser classificados como biossurfactantes, mas não foram testados para ser utilizados como biossurfactantes.

SHEPHERD et al. (1995) estudaram diferentes micro-organismos para produção extracelular de emulsificantes de alto peso molecular para uso potencial em alimentos. Foram testados 24 produtos extracelulares de bactérias, leveduras e microalgas. *Porphyridium cruentum* e *Spirulina* spp. Foram cultivadas em fotobiorreatores com meio contendo sais inorgânicos e fonte orgânica de carbono (glicose, sacarose, lactose e óleo vegetal). *P. cruentum* e *Spirulina* spp. apresentaram 0,71 e 0,70 unidades de DO de atividade emulsificante e 100 e 47% de estabilidade emulsionante, respectivamente.

BIGOGNO et al. (2002) estudaram a produção de lipídios pela microalga *Parietochoris incisa* cultivada com meio BG-11. Os resultados mostraram que a maior quantidade em fosfolipídios foi obtida na fase logarítmica de crescimento. Os autores verificaram também que *P. incisa* é extremamente rica em triacilgliceróis (TAG), que chegam a 43% (do total de ácidos graxos) na fase logarítmica e até 77% na fase estacionária.

Segundo XUE et al. (2002) os glicolipídios são os maiores componentes lipídicos das membranas (cloroplasto e fotossintética) das cianobactérias. Estes mesmos autores estudaram a composição de glicolipídios da microalga *Spirulina platensis*, e os resultados mostraram 28,2% de glicolipídios do total lipídico.

SZUHAJ et al. (1989) relatam que *Spirulina maxima* e *Spirulina platensis* são fontes de fosfolipídios (fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol) e as clorofíceas *Dunaliella bardawil* e *Chlorella minutissima* (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamona, difosfatidilglicerol, fosfatidilinositol).

As microalgas que produzem maior conteúdo em fosfolipídios são *Phaeodactylum tricoratum* (47%), *Cylindrotheca closterium* (45%), *Stichococcus bacillaris* (43%) e *Scenedesmus* sp. (41%), segundo CEVC (1993). As maiores produtoras de glicolipídios e fosfolipídios são as cianobactérias (até 41 e 50%) e as clorofíceas (até 26 e 53%), respectivamente (BOROWITZKA, 1988).

2.4.1 Metabolismo de produção de biossurfactantes

A produção de biossurfactantes pode ser induzida por hidrocarbonetos ou substratos insolúveis em água. Porém, os biossurfactantes também podem ser produzidos a partir de substratos solúveis em água, especialmente carboidratos (MULLIGAN, 2005; KARANTH et al. 1999; DESAI e BANAT, 1997).

As vias metabólicas envolvidas na síntese de precursores para produção de biossurfactantes são diversas e dependem da natureza da principal fonte de carbono utilizada no meio de cultivo. Por exemplo, quando se utiliza carboidratos como única fonte de carbono no meio de cultivo para a produção de glicolípido, o fluxo de carbono é regulado de tal forma que ambas as vias lipogênicas (formação de lipídios) e de formação da porção hidrofílica (através da via glicolítica) são especialmente supridas pelo metabolismo microbiano (FONTES et al., 2008), como mostra a Figura 5.

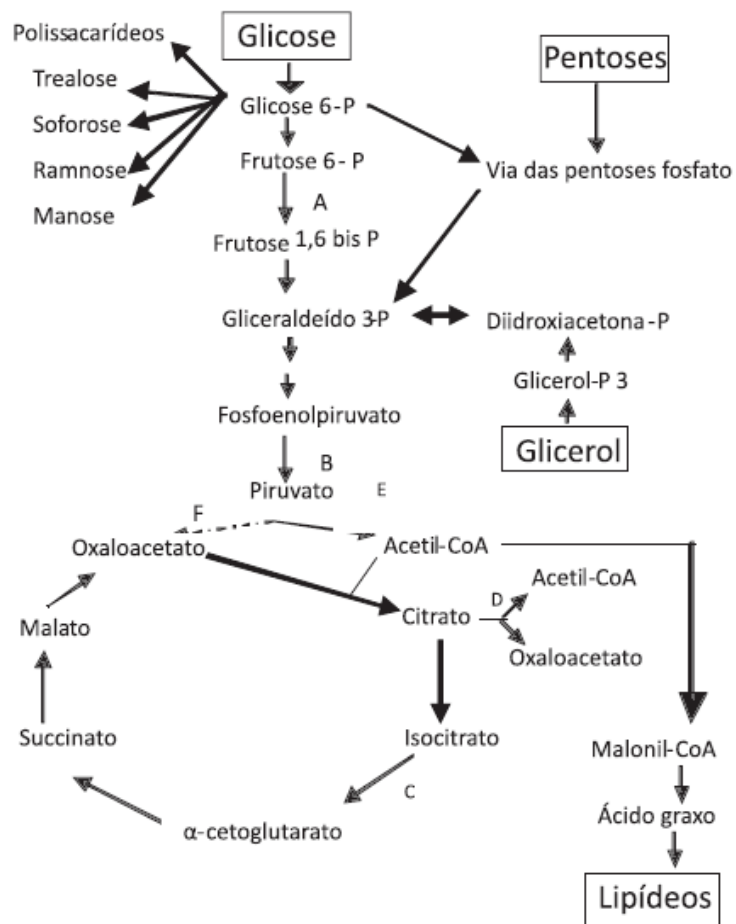


Figura 5 Metabolismo intermediário relacionado à síntese de precursores de biossurfactantes a partir da utilização de carboidratos como substratos. Enzimas chaves para o controle do fluxo de carbono: A. fosfofrutoquinase; B. Piruvato quinase; C. isocitrato desidrogenase; D. citrato liase (presentes apenas em leveduras oleaginosas e fungos). E: piruvato desidrogenase; F: piruvato carboxilase. FONTE: FONTES et al. (2008)

As reações catalisadas pela piruvato quinase e fosfofrutoquinase-1 são irreversíveis; desta forma, outras enzimas, as quais são exclusivas para gliconeogênese, são requeridas para contornar tais reações. As principais reações são apresentadas na Figura 6, até a formação da glicose 6-fosfato que é a principal precursora dos polissacarídeos, dissacarídeos a serem formados para produção da porção hidrofílica dos glicolipídios.

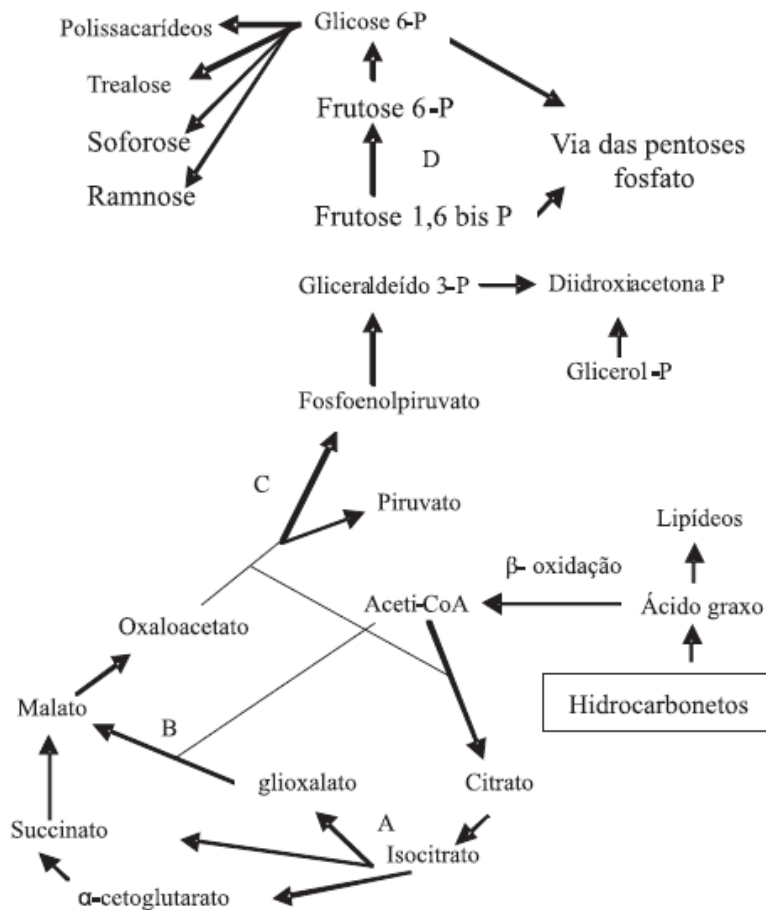


Figura 6 Metabolismo intermediário relacionado à síntese de precursores de biossurfactantes a partir da utilização de hidrocarbonetos como substratos. As enzimas chaves são: A. isocitrato liase; B. malato sintase; C. fosfoenolpiruvato carboxilase; D. frutose – 1,6 bifosfatase. FONTE: FONTES et al. (2008)

De acordo com SYDATK e WAGNER (1987) a biossíntese do emulsificante pode acontecer seguindo quatro caminhos diferentes: síntese do carboidrato e do lipídeo; síntese da metade de carboidrato, enquanto que a síntese da metade lipídica dependerá do comprimento da cadeia do substrato carbônico presente no meio; síntese da metade lipídica, enquanto que a

síntese da metade de carboidrato dependerá do substrato utilizado; síntese das metades carboidrato e lipídica, dependendo do substrato.

2.4.2 Fatores que afetam a produção de biossurfactantes

2.4.2.1 Fonte de macronutrientes

Carbono e nitrogênio são os macronutrientes de maior importância na produção de biossurfactantes. Diversos trabalhos relatam a influência destes macronutrientes, tanto em relação à fonte quanto a concentração destes compostos no meio de cultivo.

A utilização industrial dos biossurfactantes tem sido dificultada devido aos altos custos de produção associados ao uso de substratos dispendiosos. Por outro lado, estes custos podem ser significativamente reduzidos pelo uso de fontes alternativas de nutrientes, com baixo custo, como melação (GALLERT e WINTER, 2002).

MAKKAR e CAMEOTRA (1997) utilizaram no cultivo de *Bacillus subtilis* MTCC 2423 e *Bacillus subtilis* MTCC 1427, melação como fonte de carbono. A máxima produção de biossurfactantes foi evidenciada pela diminuição da tensão superficial e foi alcançada por ambas as cepas no final da fase estacionária. Como resultado do acúmulo de biossurfactantes, a tensão superficial do meio foi diminuída para 29 e 31 mN.m⁻¹ por MTCC 2423 e MTCC 1427, respectivamente.

COSTA (2004) verificou a produção de biossurfactantes pelo fungo filamentosso *Aspergillus fumigatus* por fermentação em estado sólido. Farelo de arroz desengordurado foi utilizado como fonte de nutrientes, com fontes adicionais de carbono de origem fóssil (ciclohexano, n-hexano e óleo diesel) e não fósseis (glicerina e óleo de soja). Melhores respostas de atividade emulsificante foram obtidas quando foram utilizadas fontes de carbono de origem fóssil nos cultivos.

O fungo filamentosso *Curvularia lunata* IM 2901 produziu agente emulsificante extracelular quando cresceu em meio líquido contendo glicose. Caracterizações químicas preliminares mostraram que o bioemulsificante continha 34% de carbono, 5,7% de hidrogênio, 1,8% de nitrogênio e 0,15% de enxofre, sendo um complexo proteína (25%) e polissacarídeo (48%). O açúcar presente foi identificado como um polímero de D-glicose (PARASZKIEWICZ et al., 2002).

FERRAREZZO (1998) isolou 111 linhagens de micro-organismos a partir de efluente de indústria de margarina e sabão, sendo estas linhagens testadas quanto a capacidade de

produzir bioemulsificante. Dentre estes micro-organismos as linhagens B1 e B9, identificadas como *Bacillus* sp., apresentaram os melhores valores de emulsificação. Foi estudada a produção de bioemulsificante em função da fonte de carbono (óleo de soja e glicose) e pH do meio de cultivo (pH 5,0; 7,0 e 11,0) bem como sua capacidade de emulsionar compostos aromáticos (tolueno e xileno) e misturas de hidrocarbonetos alifáticos e cíclicos (querosene e óleo diesel) além de triglicerídios (óleo de soja). Os melhores índices de emulsificação ocorreram quando as linhagens B1 e B9 foram cultivadas em meio GYP (glicose, extrato de levedura, peptona) em pH 7,0 após 10 h de cultivo em relação a óleo de soja (43,4%), querosene (44,0%), tolueno (40,4%), óleo diesel (44,8%) e xileno (45,0%). Estas linhagens provocaram pequena diminuição da tensão superficial dos meios de cultivo.

Bacillus subtilis ATCC 21332 produziram surfactina, biossurfactantes lipopeptídico, utilizando batata como substrato. A produção do biossurfactantes resultou na redução da tensão superficial de 71,3 mN.m⁻¹ para 28,3 mN.m⁻¹ (água residuária contendo batata) e para 27,5 mN.m⁻¹ (meio contendo sais minerais) (FOX e BALA, 2000).

CIRIGLIANO E CARMAM (1984) mostraram que a levedura *Y. lipolytica* produz biossurfactantes a partir de diferentes fontes de carbono, tais como hexadecano, parafina, óleo de soja, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de algodão, sendo que com hexadecano houve maior produção de biossurfactantes.

SARUBBO et al. (2006) produziram biossurfactantes utilizando glicose como fonte de carbono a partir da levedura *C. lipolytica* IA 1055, o qual apresentou uma alta atividade de emulsificação. Estes autores mostraram que não é necessária a presença de hidrocarbonetos para indução da biossíntese de surfactantes.

AMARAL et al. (2006) utilizaram também como fonte de carbono a glicose para a síntese do biossurfactantes denominado Yansan, a partir de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682. Yansan apresentou alta atividade de emulsificação e capacidade de estabilização de emulsões óleo/água. Adicionalmente, meios de cultura contendo lactose como substrato foram utilizados para a produção de manoproteínas, com propriedades emulsificantes, pela levedura *K. marxianus* (LUKONDEH et al., 2003).

CASTIGLIONI (2006) cultivou o fungo *Aspergillus fumigatus* em meio sólido para a produção de biossurfactante, sem e com fonte adicional de carbono (óleo diesel). Os melhores resultados para atividade emulsificante foram encontrados dos cultivos na ausência de fonte adicional de carbono.

Pseudomonas aeruginosa apresentou maior produção de ramnolipídios quando a cultura alcançou a fase estacionária de crescimento devido à limitação de fonte de nitrogênio (DESAI e DESAI, 1993).

KIM et al. (2002) utilizaram diferentes fontes de carbono e nitrogênio no cultivo de *Candida antarctica* visando estimular a produção de biossurfactantes. A fonte de carbono óleo de soja apresentou maior eficiência na produção de biossurfactantes. Dentre as fontes de nitrogênio estudadas, maiores quantidades de glicolipídios foram alcançadas quando utilizou-se sais de amônio e o maior rendimento foi obtido com NH_4NO_3 .

JOHNSON et al. (1992) relataram a influência da fonte de nitrogênio na produção de biossurfactantes pela levedura *Rhodotorula glutinis* IIP-30, tendo o nitrato de potássio apresentado o melhor desempenho em relação às outras fontes utilizadas (sulfato de amônio e uréia).

Um parâmetro bastante estudado pelos pesquisadores é a relação quantitativa entre as fontes de carbono e nitrogênio utilizadas para a produção de biossurfactantes. Foi estudado o efeito de diferentes relações C/N na produção do bioemulsificante produzido por *Rhodotorula glutinis*, utilizando diferentes hidrocarbonetos. A atividade de emulsificação aumentou com o aumento da relação C/N na maioria dos casos, sendo esse aumento observado em condições limitantes de nitrogênio. Observações similares foram obtidas com *C. Tropicalis* (SINGH et al., 1990).

Segundo BENINCASA et al. (2002) o micro-organismo dirige seu metabolismo celular para a produção de biossurfactantes após o consumo total de nitrogênio, aumentando a produção após a fase exponencial de crescimento.

2.4.2.2 Fatores físico-químicos

Os fatores ambientais e condições de crescimento como pH, temperatura, agitação e disponibilidade de oxigênio também afetam a produção de biossurfactantes através de seus efeitos sobre o crescimento ou atividade celular (DESAI e BANAT, 1997).

GOBBERT et al. (1984) verificaram que o pH do meio desempenhou um papel importante na produção de soforolipídio por *T. bombicola*. Ramnolipídio produzido por *Pseudomonas* spp. alcançou máximo de produção em pH 6-6,5 e diminuiu acentuadamente a partir do pH 7 (GUERRA-SANTOS et al., 1984). POWALLA et al. (1989) mostraram que o pH 6,5 a 8,0 não interferiram na produção de polissacarídios por *N. corynbacteroides*.

DROUIN e COOPER (1992) mostram que a composição do biossurfactantes produzido por *A. paraffineus* foi afetada pela temperatura. *Bacillus* sp. apresentou crescimento e produziu biossurfactantes em temperatura acima de 40 °C (BANAT, 1993). BICCA et al. (1999) estudaram diferentes temperaturas (30, 37 e 40 °C) na produção de biossurfactantes por *Rhodococcus* AC 239, obtendo-se melhores resultados a 37 °C.

CAMERINI e CHANIN et al. (2005) avaliaram o efeito da temperatura, pH e umidade do meio na produção de biossurfactantes pelo fungo *Phialomonium* sp. em meio sólido. Melhores resultados foram encontrados na temperatura de 35 °C, pH 5,0 e umidade de 60%.

Agitações mais velozes podem causar redução da concentração do biossurfactante devido ao efeito da tensão de cisalhamento. A transferência de oxigênio é um parâmetro chave na otimização e aumento de escala da produção do biossurfactantes surfactina (DESAI e BANAT, 1997).

2.4.3 Técnicas de extração

Quando se colocam em contato duas fases de composições químicas diferentes, pode ocorrer a transferência de componentes de uma fase para a outra. Esta é a base física das operações de transferência de massa, como a extração. Se as duas fases ficam em contato durante um intervalo de tempo suficiente acabam por atingir um estado de equilíbrio e daí por diante não existe mais a transferência líquida dos componentes entre elas. Na maioria dos casos que tem interesse para as operações de transferência de massa, as duas fases são apenas parcialmente miscíveis, de modo que no equilíbrio ainda existem duas fases que podem ser separadas uma da outra (FOUST *et al.*, 1982).

Usualmente, estas duas fases têm composições diferentes e estas composições são, também, diferentes das que tinham as fases no instante do contato inicial. Por isso, as quantidades relativas dos componentes que são transferidos entre as fases são diferentes, de modo que se consegue uma separação entre eles. Em condições apropriadas, o contato e a separação repetida das fases pode levar a uma separação quase completa dos componentes (FOUST *et al.*, 1982).

A extração é uma importante operação unitária de separação, grandemente difundida industrialmente. O sucesso da extração freqüentemente depende do pré-tratamento ao qual a amostra foi submetida e da técnica utilizada.

Em alguns casos, pequenas partículas de material solúvel estão completamente envolvidas por uma matéria insolúvel. O solvente deve difundir através da massa e a solução resultante deve difundir para fora dessa massa, resultando a extração (TREYBAL, 1968).

Compostos químicos presentes nos micro-organismos podem, geralmente, ser extraídos no estado úmido, diretamente após a colheita. As células não necessitam estar homogeneizadas desde que elas sejam imediatamente quebradas ao entrar em contato com a solução extratora. Em alguns casos a quebra da célula torna-se necessária para facilitar a penetração do solvente e aumentar o rendimento lipídico. Isto pode ser feito utilizando uma das técnicas de ruptura celular conhecidas, como sonicagem, homogeneização, congelamento e moagem (MEDINA *et al.* 1998). DUNSTAN *et al.* (1992) extraiu lipídios de algas verdes com uma mistura de clorofórmio-metanol-água (1:2:0,8 em volume) e entre estas extrações as amostras eram sonicadas a 20 °C.

Extração com amostras liofilizadas, também costuma ser utilizada. A liofilização quebra as células das microalgas, tornando a homogeneização desnecessária (MEDINA *et al.* 1998).

A extração por solvente é solução preferencial de um ou mais componentes de uma mistura sólida em contato com um solvente líquido. Essa operação unitária é uma das mais antigas empregadas na indústria química (TREYBAL, 1968).

Um sistema eficiente de extração para micro-organismos é a mistura de clorofórmio e metanol 2:1 (v/v). Em um sistema simplificado e aperfeiçoado, BLIGH e DYER (1959) usaram uma única fase de extração, clorofórmio-metanol-água (1:2:0,8 de volume, incluindo a presença de água na amostra) para extrair os lipídios de tecidos frescos. Este método é bastante utilizado para a extração lipídica de microalgas.

GUERRERO *et al.* (2000) obtiveram ácidos graxos de três espécies de plantas através de um processo conjunto de extração/saponificação utilizando como solvente etanol (96%v/v) e como agente saponificante KOH. A separação final dos ácidos graxos foi realizada utilizando um solvente orgânico (hexano) em pH 1,0.

Métodos de extrações sequenciais são bastante utilizados para microalgas, na extração de biocompostos de interesse.

MENDES *et al.* (2006) estudando a extração do ácido γ -linolênico de *Arthospira maxima*, utilizou como solventes, clorofórmio, acetona e metanol e relata que estes extraem lipídios neutros, glicolipídios e fosfolipídios, respectivamente.

Em estudo realizado com a microalga *Isochrysis galbana* foram utilizados clorofórmio para extração de lipídios neutros, clorofórmio/metanol (5:1 v/v) para extração de glicolipídios e metanol para extrair fosfolipídios (DEVOS et al., 2006).

MARTINS et al. (2007), CERQUEIRA (2007) e PINTO (2008), utilizaram a água como solvente extrator, em diferentes temperaturas, para extração de biossurfactantes de fungo (água a 90 °C) e bactéria (água a 50 °C).

2.4.4 Estimativa da atividade biossurfactante

Existem diversos métodos utilizados para determinar a atividade surfactante, onde o mais utilizado é a medição da tensão superficial do sobrenadante. Também são empregados os métodos de redução da tensão interfacial entre a fase aquosa e uma fase orgânica imiscível, atividade emulsificante óleo/água e água/óleo, estabilização de emulsão e formação de espuma (COOPER e ZAJIC, 1980).

A tensão superficial entre as interfaces ar/água e óleo/água podem ser medidas facilmente utilizando-se tensiômetro. Quanto menor a tensão superficial, maior a produção de biossurfactantes pelo micro-organismo. A tensão superficial da água destilada é de 72 mN.m⁻¹ e a adição de surfactante reduz este valor a 30 mN.m⁻¹ (DESAI e BANAT, 1997). Com adições sucessivas de surfactante, atinge-se um nível crítico, sobre o qual não se verifica mais significativa redução da tensão. A partir dessa concentração de surfactante, começa a haver a associação das moléculas anfipáticas na forma micelas. Este valor é conhecido como concentração micelar crítica (CMC) (MULLIGAN, 2005). CMC é definida como a solubilidade de um surfactante na forma de monômeros dentro de uma fase aquosa e é usado comumente para medir a eficiência de um surfactante (MULLIGAN, 2005; DESAI & BANAT, 1997).

2.4.5 Aplicações dos biossurfactantes

Os biossurfactantes, durante a última década têm sido objeto de investigação, por serem possíveis substitutos para os surfactantes sintéticos, especialmente em indústrias de alimentos, cosmética, farmacêutica, produtos de limpeza industriais e em produtos químicos agroindustriais (DASTGHEIB et al., 2008; MAKKAR e CAMEOTRA, 2002).

Na indústria alimentícia o uso de biossurfactantes é restrito, devido às questões de segurança, qualidade sensorial, custo, propriedades funcionais, costumes e leis. O fator segurança é o mais restrito e requer que o biossurfactantes seja biodegradável e não forme

compostos tóxicos ao corpo humano e ao meio ambiente (LIMA, 1997). São aplicados como emulsificante na formação da consistência e textura, bem como na dispersão de fase e na solubilização de aromas (DESAI e BANAT, 1997). Os agentes tensoativos como os biossurfactantes encontram aplicação também em panificação e produtos derivados de carne, onde influenciam as características reológicas da farinha e a emulsificação de gorduras, respectivamente (KIM et al., 1997).

Ramnolipídio, biossurfactante produzido pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, está sendo empregado no transporte de drogas insolúveis em seres humanos, e também como precursor de componentes de sabor na indústria alimentícia (RAHMAN et al., 2002).

Na agricultura, os surfactantes são necessários para hidrofilição de solos pesados, para obtenção de umidade adequada e para realizar igual distribuição dos fertilizantes nos mesmos. Na indústria de cosméticos são encontrados em shampoos e condicionadores (FIECHTER, 1992).

Os biossurfactantes podem ser aplicados na biorremediação de água e solo, pois eles aumentam a área superficial água/óleo e aceleram a degradação de vários óleos por micro-organismos, como algumas espécies de cianobactérias e alguns patógenos como *Staphylococcus aureus* e *Serratia* sp. (BANAT et al., 2000; VOLKERING et al., 1998).

A biorremediação pode ser realizada por dois diferentes métodos, bioaugmentação e bioestimulação. O processo menos empregado é a bioaugmentação que envolve a adição de micro-organismos para degradar o contaminante. A bioestimulação, método mais empregado, consiste na introdução de nutrientes adicionais, como nitrogênio e fósforo, na forma orgânica e/ou inorgânica no sistema contaminado, o qual aumenta a população de micro-organismos endógenos (SARKAR et al., 2005).

CERQUEIRA (2007) estudou o processo de biorremediação de solos contaminados por compostos de origem animal (óleo de pescado bruto) e mineral (tolueno) com adição de biossurfactantes, produzido por *Aspergillus fumigatus*, no meio. Os resultados demonstraram que a maior taxa de remoção do contaminante óleo de pescado foi de 59,5% em 90 d de processo, e a maior taxa de remoção do contaminante tolueno foi de 100% em 14 d do processo.

BENINCASA (2007) investigou a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* utilizando resíduos agroindustriais como substrato e também a utilização do mesmo biossurfactante na biodegradação de hidrocarbonetos em solo contaminado. Com a adição de 1 mg de biossurfactantes.g⁻¹ de solo contaminado, mostrou uma redução de 85% dos hidrocarbonetos de petróleo no solo estudado. A utilização de biossurfactantes, para

biorremediação, tem sido limitada, devido ao seu elevado custo produção, mas com a produção de biossurfactantes a partir de subprodutos, se consegue uma minimização dos custos de processo de biorremediação.

Os biossurfactantes são bastante atrativos nas indústrias de materiais de higiene e cosméticos. Um produto contendo 1 mol de soforolipídio e 12 moles de propileno glicol apresentou excelente compatibilidade com a pele como hidratante (DESAI e BANAT, 1997). Os biossurfactantes também são utilizados como agentes terapêuticos. Vários ramnolipídios exibem efeitos antibacterianos e antivirais. Lipopeptídios podem atuar como antibióticos, antivirais e agentes antitumorais (CAMEOTRA e MAKKAR, 2004).

A surfactina é um dos mais efetivos biossurfactantes, pois pode reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN.m⁻¹ e possui várias atividades biológicas, tais como função antibacteriana ou atividade antiviral, atividade citoplasmática, inibição da formação de coágulo fibroso e estímulo da atividade macrofagócita (MORIKAWA et al., 2000).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of Microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*, 264, 130-134, 2007.
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. *Outdoor and indoor* cultivation of *Spirulina platensis* in the extreme south of Brazil. *Zeitschrift für Naturforschung*, 63c, 85-90, 2008.
- BANAT, I. M. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. *Biotechnol. Lett.* 15, 591–594, 1993.
- BANAT, I. N.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 53, 495-508, 2000.
- BARTH, G.; GAILLARD, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*, 19, 219-237, 1997.
- BENEMANN, J. R. CO₂ mitigation with microalgae systems. *Energy Conversion Management*, 38, S475–S479, 1997.
- BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M. A.; MORAES, I. O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LB1 growing on soapstock as the carbon source. *Journal of Food Engineering Essex*, 54, 283-288, 2002.

- BICCA, C.F.; FLECK, L.C.; AYUB, M.A.Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus rubbe* and *Rhodococcus erythropolis*. *Braz. J. Microbiol.* 30, 231–236, 1999.
- BIGOGNO, C.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; COHEN, Z. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry*, 60, 497–503, 2002.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917, 1959.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152, 41-52, 1999.
- BOROWITZKA, M. A. Algal growth media and sources of culture. *In*: BOROWITZKA, M. A. e BOROWITZKA, L. J., eds, *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, 456-465, 1988.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Current Opinion in Microbiology*, 7, 262-266, 2004.
- CAMERINI, F. V; CHANIN, C. Produção de biossurfactantes fúngico por fermentação em estado sólido. Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Alimentos - Universidade Federal do Rio Grande-RS, 2005.
- CASTIGLIONI, G. L. Modelagem e simulação da produção de biossurfactantes e lipase por fermentação em estado sólido. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande-RS, 2006.
- CERQUEIRA, V.S. Produção de biossurfactantes e lipase por *Aspergillus fumigatus* cultivado em estado sólido e avaliação da biorremediação em derrames de óleos e derivados. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande-RS, 2007.
- CEVC, G. *Phospholipids – Handbook*. Marcel Dekker, Inc. New York, EUA. 1993.
- CHAUTON, M. S.; STORSETH, T. R.; KRANE, J. Analysis of whole cells of *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae), and comparison with analysis of lipophilic extracts. *Journal of Phycology*, 40, 611-618, 2004.

- CHINI ZITTELLI, G.; RODOLFI, L.; BIONDI, N.; TREDICI, M. R. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture*, 261, 932–943, 2006.
- CHINI ZITTELLI, G.; RODOLFI, L.; TREDICI, M.R. Mass cultivation of *Nannochloropsis* sp. in annular reactors. *J. Appl. Phycol.*, 15, 107-114. 2003.
- CHINI ZITTELLI, G.; SOMIGLI, S.; RODOLFI, L.; TREDICI, M.R. Outdoor mass cultivation of *Isochrysis* sp. in annular reactors. Abstracts of the First Latinoamerican Congress on Algal Biotechnology (CLABA), Buenos Aires, Argentina, p. 45, 2004.
- CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. Growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 461-465, 2004.
- CIRIGLIANO, M. C.; G. M. CARMAN. 1984. Isolation of bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 747-750.
- COLLA, L. M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. *Zeitschrift Für Naturforschung* , 59c, 55-59, 2004.
- COLLA, L. M.; MUCCILLO-BAISCH, A. L; COSTA, J. A. V. *Spirulina platensis* effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerols in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51, 2, 405-411, 2008.
- COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E. Surface active compounds from microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* 26, 229–253, 1980.
- COSTA, E. Produção e avaliação das propriedades de biossurfactantes produzido em fermentação fúngica em estado sólido. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande-RS, 2004.
- COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 18, 7, 603-607, 2002.
- COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE-FILHO, P. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. *Bioresource Technology*, 92, 3, 237-241, 2004.

- COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE-FILHO, P. *Spirulina platensis* growth in open Raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions. *Zeitschrift Für Naturforschung*, 58c, 76-80, 2003.
- COSTA, J. A. V.; LINDE, G. A.; ATALA, D. I. P.; MIBIELLI, G. M.; ARRIECHE, L.; KRÜGER, R. T. Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 16, 15-18, 2000.
- COZZA, K. L. *Spirulina platensis* em meios naturais e sintéticos: fatores nutricionais e custos. Dissertação de mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande-RS, 1999.
- DASTGHEIB, S. M. M.; AMOOZEGAR, M. A.; ELAHI, E.; ASAD, A.; BANAT, I. M. Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery. *Biotechnol Lett*, 30, 263–70, 2008.
- DESAI, J. D.; BANAT I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Rev*, 61, 47–64, 1997.
- DESAI, J. D.; DESAI, A. J. Production of biosurfactants. In: KOSARIC, N. (Ed.) Biosurfactants: production, properties, applications. New York: CRC Press, 1, 19-98, 1993.
- DROUIN, C. M.; COOPER, D. G. Biosurfactant and aqueous twophase fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 40:86–90, 1992.
- DUARTE FILHO, P. F. M. Crescimento da cianobactéria *Spirulina platensis* em diferentes configurações de fotobiorreator e condições de cultivo. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande-RS, Brasil, 2002.
- DUNSTAN, G. A.; VOLKMAN, J. K.; JEFFREY, S. W.; BARRETT, S. M. Biochemical composition of microalgae from the green algal classes *Chlorophyceae* and *Prasinophyceae*. 2. Lipid classes and fatty acids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 161, 115-134. 1992.
- FERRAREZZO, E. M. Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de bioemulsificantes a partir de efluentes de indústria de margarina e sabão. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP, Brasil, 1998.
- FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends Biotechnol.* 10, 208–217, 1992.

- FONTES G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactantes por levedura. *Quim. Nova*, 31, 8, 2091-2099, 2008.
- FOUST, A. S.; WENZEL, L. A.; CLUMP, C. W.; MAUS, L.; ANDERSEN, L. B. Princípios das operações unitárias. Editora LTC, 2 ed, Rio de Janeiro, RJ. 1982.
- FOX, S. L.; BALA, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. *Bioresource Technology*, 75, 235-240, 2000.
- GALLERT, C.; WINTER, J. Solid and liquid residues as raw materials. *Biotechnology. Naturwissenschaften*, 89, 483–496, 2002.
- GANDRA, E. A.; FONSECA, G. G.; CORRÊA, A. P. A.; SCLOWITZ, L. F. Produção de cogumelos comestíveis utilizando resíduos agroindustriais. Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande-RS, 2000.
- GOBBERT, U.; LANG, S.; WAGNER, F. Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulopsis bombicola*. *Biotechnol. Lett.* 6, 225–230, 1984.
- GUERRA-SANTOS, L. H.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 301–305. 1984.
- HASAN, S. D. M. Modelagem e simulação da transferência de calor em fermentação semi-sólida de farelo de arroz. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande-RS, 1998.
- INOH, Y.; KITAMOTO, D.; HIRASHIMA, N.; NAKANISHI, M. Biosurfactant MEL-A dramatically increases gene transfection via membrane fusion. *Journal of Controlled Release*, 94, 423-431, 2003.
- JOHNSON, V.; SINGH, M.; SAINI, V. S.; ADHIKARI, D. K.; SISTA, V.; YADAV, N. K. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *Biotechnol. Lett.* 14, 487–490, 1992.
- JUNIOR, C. G.; VENDRUSCOLO, F.; PIAIA, J. C. Z.; RODRIGUES, R. C. Produção de biossurfactantes utilizando o processo de fermentação em estado sólido. Projeto de Conclusão do Curso de Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande-RS, 2003.

- KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K. Microbial production of biosurfactant and their importance. *Current Science*, 77, 1, 116-126, 1999.
- KIM, H. S.; JEON, J. W.; LEE, H. W.; PARK, Y. I.; SEO, W. T.; OH, H. M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y.; YOON, B. D. Extracellular production of a glycolipids biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *Candida Antarctica*. *Biotechnology Letters*, 24, 225-229, 2002.
- KIM, H. S.; YOON, B. D.; LEE, C. H.; SUH, H. H.; OH, H.M.; KAYSURAGI, T.; TANI, Y. Production and Properties of a Lipopeptide Biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84, 1, 41-46, 1997.
- KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. *Pure & Appl. Chern.*, 64, 11, 1731-1737, 1992.
- LANG, S. Biological Amphiphiles (microbial biosurfactants). *Current Opinion I Colloid & Interface Science*, 7, 12-20, 2002.
- LIMA, A. S.; SAMPAIO, R. M.; ALEGRE, R. M. Bioemulsifier production: Study of the operational conditions and stabilization properties. *Tecnologia Química*, 17, 2, 18-22, 1997.
- LINDE, G.A. Produção de pectinase por fermentação semi-sólida em biorreator de coluna. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande-RS, 2000.
- LOPES, T. M.; COSTA, J. A. V.; TRINDADE, G. S. Differences in the sensibility of multi-drug resistant (MDR) and non-MDR human tumor cells to different concentrations of *Spirulina platensis*. In: *Les Cyanobactéries pour la Santé, la Science et le Développement*, Embiez Island, p. 42, 2004.
- LUKONDEH, T.; ASHBOLH, N. J.; ROGERS, P. L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 grown on a lactose-based medium as a source of natural bioemulsifier. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 30, 715-720, 2003.
- MAEDA, K.; OWADA, M.; KIMURA, N.; OMATA, K. KARUBE, I. CO₂ fixation from the flue gas on coal-fired thermal power plant by microalgae. *Energy Conversion and Management*, 36, 6-9, 717-720, 1995.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 58, 428-434, 2002.

- MARTINS, R. G.; PINTO, M.H.; SILVA, M.A.; RADMANN, E.M.; COSTA, J.A.V. Influência do teor de umidade e estudo da condição de extração na produção de biossurfactantes pela bactéria *Corynebacterium aquaticum* em processo fermentativo em estado sólido. Resumo publicado no XIX Salão de Iniciação Científica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS, 2007.
- MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactantes em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. *Quim. Nova*, 31, 8, 1942-1947, 2008.
- MATERASSI, R.; PELOSI, E.; PINZANI, E.; PUSHPARAJ, B.; TREDICI, M. R. Sistema integrato per la coltura massiva all'aperto di microrganismi fotosintetici. CNR N° FI/95/A/64. (1995).
- MEDINA, A. R.; GRIMA, E. M.; GIMENEZ, A. G.; GONZALEZ, M. J. I. Downstream processing of alga polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances*, 16, 3, 517-580, 1998
- MENDES, R. L.; REIS, A. D.; PALAVRA, A. F. Supercritical CO₂ extraction of c-linolenic acid and other lipids from *Arthrospira (Spirulina) maxima*: Comparison with organic solvent extraction. *Food Chemistry*, 99, 57–63, 2006.
- MOHANTY, P.; SRIVASTAVA, M.; KRISHNA, K. B. The photosynthetic apparatus of *Spirulina*: electron transport and energy transfer. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)* Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997.
- MORAES, A. F. Enriquecimento protéico do farelo de arroz por fermentação semi-sólida em biorreator de leito fixo. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande-RS, 1999.
- MORAIS, M, G.; COSTA, J. A. V. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 129, 3, 439-445, 2007.
- MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. *Ciência e Agrotecnologia*, 32, 1245-1251, 2008
- MORAIS, M. G.; MIRANDA, M. Z.; COSTA, J. A. V. Biscoitos de chocolate enriquecidos com *Spirulina platensis*: características físico-química, sensorial e digestibilidade. *Alimentos e Nutrição*, 17, 333-340, 2006.

- MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Biofixation of CO₂ from synthetic combustion gas using cultivated microalgae in three-stage serial tubular photobioreactors. *Zeitschrift für Naturforschung*, 2011. No prelo.
- MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and cultivation of a new strain of *Arthrospira* from Mangueira Lagoon in Southern Brazil. *Zeitschrift für Naturforschung*, 63, 144-150, 2008.
- MORIKAWA, M.; YOSHIHIHIKO, H.; IMANAKA, T. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1488, 211-218, 2000.
- MULLIGAN, C. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133, 183-198, 2005.
- OLGUÍN, E.; DOELLE, H.; MERCADO, G. Resource recovery through recycling of sugar processing by-products and residuals resources. *Conservation and Recycling*, 15, 85-94, 1995.
- OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Quim. Nova*, 27, 1, 131-138, 2004.
- PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A.; DLUGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. *Journal of Biotechnology*, 92, 3, 287-294, 2002.
- PICCARDI, R.; FROSINI, A.; ENA, A.; MARGHERI, M. C.; DEGL'INNOCENTI, A.; CALAMAI, L.; TREDICI, M. R. Cyanobacterial strain of the genus *Nostoc*, cultures, biomasses, extracts, bioactive molecules obtained therefrom and use thereof. *European patent*, B30/0029, 2000.
- PINTO, M. H. Produção de biossurfactantes bacteriano e fúngico por fermentação em estado sólido e submersa utilizando resíduos agroindustriais. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande-RS, 2008.
- POERSCHMANN, J.; SPIJKERMAN, E.; LANGER, U. Fatty acid patterns in *Clamydomonas* sp. as a marker for nutritional regimes and temperature under extremely acidic conditions. *Microb. Ecol.*, 48, 78–89, 2004.
- POWALLA, M.; LANG, S.; WRAY, V. Penta- and disaccharide lipid formation by *Nocardia corynebacteroides* grown on *n*-alkanes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31:473–479, 1989.

- RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. *Química Nova*, 31, 7, 1609-1612, 2008.
- RADMANN, E. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open Raceway ponds. *Aquaculture*, 265, 118-126, 2007.
- RADMANN, E. M.; SANTOS, G. C.; CERQUEIRA, V. S.; CALHEIROS, M. N.; COSTA, J. A. V.; Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. *Alimentos e Nutrição*, 17, 373-379, 2006.
- RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnol Prog.* 18, 1277–81, 2002.
- REICHERT, C. C.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 23, 1, 23-28, 2006.
- REINEHR, C. O. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em modo semicontínuo - Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos –Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande-RS, 2003.
- REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Repeated batch cultivation of the microalga *Spirulina platensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 9, 937-943, 2006.
- RODOLFI, L.; BASSI, N.; PARENTE, I.; PADOVANI, G.; BONINI, G.; CHINI ZITTELLI, G.; BIONDI, N.; TREDICI, M. R. Lipid production from marine microalgae: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor cultivation in pilot photobioreactors. Abstract of 8th International Marine Biotechnology Conference, Eilat (Israel), p 87, 2007.
- RODOLFI, L.; CHINI ZITTELLI, G.; BARSANTI, L.; ROSATI, G.; TREDICI, M. R. Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. Mass cultivation. *Biomol. Eng.* 20, 243–248, 2003.
- RODOLFI, L.; CHINI ZITTELLI, G.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 1, 100-112, 2009.
- ROSA, A. P. C.; CARVALHO, L. F.; GOLDBECK, L.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. *Energy Conversion and Management*, 2011. *No prelo*

- ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 154-162, 1999.
- SAKAI, N.; SAKAMOTO, Y.; KISHIMOTO, N.; CHIHARA, M.; KARUBE, I. *Chlorella* strains from hot springs tolerant to high temperature and high CO₂. *Energy Conversion and Management*, 36, 6-9, 693-696, 1995.
- SANTOS, L. O.; MAGNANI, G.; COLLA, E. Amiloglicosidade e pectinases via fermentação semi-sólida em fermentador de tambor rotativo. Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande, 2001.
- SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. *Environmental Pollution*, 136, 187-195, 2005.
- SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M.; TAKAKI, G. M. C. Production and stability Studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9, 4, 2006.
- SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SHUTHERLAND, I. W.; ROLLER, S. Novel bioemulsifer from microorganisms for use in foods. *J Biotechnol* 40: 207-217, 1995.
- SYLDATK, C.; WAGNER, F.; *Biosurfactants and Biotechnology*, Marcel Dekker: New York, cap. 3, 1987.
- SZUHAJ, B. F. Lecithins sources, manufacture & uses. *American Oil Chemists Society.*, 74-76, 1989.
- TAMIYA, H.; SHIBATA, K.; SASA, T.; IWAMURA, T.; MORIMURA, Y. Effect of Diurnally Intermittent Illumination of the Growth and some Cellular Characteristics of *Chlorella*, in Algal Culture. From Laboratory to Pilot Plant, Publ. n 600, BURLEW, J. S., ed. The Carnegie Institution, Washington D.C., 1953. *In*: RICHMOND, A. Large scale microalgal culture and applications. In Progress in Phycological Research. Round & Chapman (Eds). Biopress Ltd. 7, p. 61, 1990.
- TREDICI M. R.; CHINI ZITTELLI, G.; BIAGIOLINI, S.; CAROBBI, R.; FAVILLI, F.; MANNELLI, D.; PINZANI, E.. Impianto a fotobiorreattori tubolari per la coltura industriale di microrganismi fotosintetici. INALCO-CNR. N° FI/93/A/177. 1993.
- TREDICI, M. R. Photobioreactors: designs and strategies to achieve 10% solar energy conversion efficiency through microalgae cultivation. Aqua 2006, Florence, Italy, 9-13 May 2006.

TREDICI, M. R.; CARLOZZI, P.; CHINI ZITTELLI, G.; PINZANI, E.; FAVILLI, F.; MANNELLI, D.; MATERASSI, R. Sistema di agitazione e termostatazione della coltura in un fotobioreattore a pannello alveolare verticale. CNR. N° 9443 -A/90, 1990.

TREDICI, M. R.; MANNELLI, D.; MATERASSI, R. Impianto perfezionato per la coltura in strato laminare sottile dei microrganismi fotosintetici. CNR. N° 9357 - A/88. 1988.

TREDICI, M. R.; RODOLFI, L. Reactor for industrial culture of photosynthetic micro-organisms. *Patent* WO 2004/074423 A2 (to Università degli Studi di Firenze). 2004.

TREICHEL, H.; WENDT, R.; SARAIVA, C.; OGRODOWSKI, R. Estudo de um biorreator tipo tambor rotativo para o enriquecimento protéico do farelo de arroz. Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande, 1998.

TREYBAL, R. E. Mass transfer operations. McGraw-Hill Kogakusha, London, 1968.

VOLKERING, F.; BREURE, A. M.; RULKENS, W. H. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation*, 8, 401-417, 1998.

VONSHAK, A.; GUY, R. Photoadaptation, photoinhibition and productivity in the blue-green alga *Spirulina platensis* grown outdoors. *Plant Cell Environ.*, 15, 5, 613-616, 1992.

WEN, Z. Y.; CHEN, F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*, 4, 21, 273-94, 2003.

XUE, C.; HU, Y.; SAITO, H.; ZHANG, Z.; LI, Z.; CAI, Y.; OU, C.; LI, H.; IMBS, A. B. Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*, 77, 9-13, 2002.

CAPÍTULO IV – ARTIGOS

4 ARTIGOS

Para apresentação e compreensão dos resultados obtidos, o trabalho foi dividido em quatro artigos, sendo o primeiro realizado no Brasil no laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande – FURG e os demais realizados juntamente ao grupo do Professor Mario Tredici na Università degli Studi di Firenze na Itália:

ARTIGO 1: Cultivo autotrófico e mixotrófico de microalgas para produção de biossurfactantes;

ARTIGO 2: Seleção de microalgas para produção de biossurfactantes;

ARTIGO 3: Produção de biossurfactantes por microalgas em diferentes fotobiorreatores;

ARTIGO 4: Cultivo *outdoor* da microalga marinha *Tetraselmis suecica* OR para produção de biossurfactantes.

4.1 CULTIVO AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO DE MICROALGAS PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

Elisângela M. Radmann e Jorge Alberto V. Costa*

*Laboratório de Engenharia Bioquímica, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Caixa Postal 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil. Fax: +55-53-3233 8745. E-mail: jorge@pq.cnpq.br

4.1.1 RESUMO

As microalgas são utilizadas tanto como alimento quanto fonte de compostos bioativos, como os biossurfactantes. A fonte de carbono nos cultivos de microalgas representa importante componente dos custos de produção, de modo que reduzir a quantidade de meio inorgânico sem perder em produtividade pode ser uma alternativa para diminuir custos de produção da biomassa. Os biossurfactantes apresentam uma vasta aplicação industrial, com destaque na indústria alimentícia sendo utilizados como emulsionante, espessante, entre outros. O objetivo deste trabalho foi selecionar e estimular microalgas quanto à produção de biossurfactantes, através de cultivo mixotrófico. As microalgas foram cultivadas em Erlenmeyer de 2 L com diferentes fontes de carbono (melaço, glicose e NaHCO_3). Em ensaios preliminares a microalga *Spirulina* sp. LEB-18 apresentou máxima concentração de biomassa ($2,55 \text{ g.L}^{-1}$) quando foi utilizada 5 g.L^{-1} de glicose no meio de cultivo. O mesmo comportamento de crescimento foi observado quando estudou-se cultivos autotróficos e mixotróficos das microalgas *Synechococcus nidulans* LEB-25, *Chlorella vulgaris* LEB-106, *Chlorella minutissima* LEB-108 e *Chlorella homosphaera*. A tensão superficial dos meios das microalgas reduziu de 70 para 43 mN.m^{-1} , indicando a produção de biossurfactantes pelas microalgas estudadas utilizando glicose como fonte de carbono.

Palavras-chave: biossurfactantes, glicose, melaço, microalga.

4.1.2 ABSTRACT

Microalgae are used both as food as source of bioactive compounds such as biosurfactants. The carbon source in the cultivation of microalgae represents an important component of production costs, so reducing the amount of inorganic medium without losing productivity can be an alternative to reduce production costs of biomass. The biosurfactants have a wide range industrial application, especially in the food industry being used as an emulsifier, thickening agent, among others. The aim of this work was to select and stimulate the production of biosurfactants by microalgae in mixotrophic culture. The microalgae were grown in a 2 L Erlenmeyer flask with different carbon sources (molasses, glucose and NaHCO_3). In preliminary tests, the microalga *Spirulina* sp. showed maximum biomass concentration (2.55 g L^{-1}) when was used 5 g L^{-1} of glucose in the medium. The same growth behavior was observed when we Studied autotrophic and mixotrophic cultures of *Synechococcus nidulans* LEB-25, *Chlorella vulgaris* LEB-106, *Chlorella minutissima* LEB-108 and *Chlorella homosphaera*. The reducing of the surface tension of the medium was 70 to 43 mN. m^{-1} , indicating the biosurfactant production by the microalgae Studied using glucose as carbon source.

Keywords: biosurfactants, glucose, molasses, microalga.

4.1.3 INTRODUÇÃO

A produção mundial de surfactantes ultrapassa 3 milhões de toneladas por ano (BANAT et al. 2000). De acordo com BOGNOLO (1999), os surfactantes atualmente utilizados são derivados do petróleo, de, 70 a 75% destes são consumidos por países industrializados. O interesse por biossurfactantes tem aumentado nos últimos anos devido às suas diversidades e potenciais aplicações no processamento de alimentos, proteção ambiental, fármacos, recuperação de resíduos oleosos, entre outras (LANG, 2002).

Os biossurfactantes são moléculas complexas que compreendem uma ampla variedade de estruturas químicas como glicolipídios, lipopeptídios, lipoproteínas, lipídios neutros, ácidos graxos e fosfolipídios (DESAI e BANAT, 1997). Estudos relatam que microalgas são grandes produtoras de glicolipídios, fosfolipídios e lipídios neutros (RODOLFI et al. 2009; XUE et al., 2002; BIGOGNO et al., 2002; CEVC, 1993; KOSARIC, 1992; SZUHAJ, 1989; BOROWTZKA, 1988), o que justifica o estudo da produção de biossurfactantes por microalgas.

Uma grande vantagem de cultivar microalgas para produção de biossurfactantes é que muitas são GRAS (*generally recognized as safe*). Organismos com certificado GRAS não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, o que permite sua utilização para aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica (BARTH e GAILLARD, 1997). Além disso, as microalgas são fontes de corantes naturais e fármacos e também podem ser utilizadas na aquicultura (BROWN et al., 1996), produção de biocombustíveis e biofixação de dióxido de carbono (CO₂) (ROSA et al. 2011; MORAIS et al., 2011; TREDICI, 2010; RODOLFI et al., 2009; RADMANN e COSTA, 2008; MORAIS e COSTA, 2007).

A produção dos biossurfactantes para fins comerciais é limitada devido aos altos custos envolvidos, principalmente quanto à fonte de nutrientes para os micro-organismos. Entretanto, o uso de substratos de baixo custo, como melão e glicose, podem minimizar este problema.

A fonte de carbono é um dos principais componentes na produção de biomassa microalgal. A fonte de carbono utilizada no processo fotossintético das microalgas é o bicarbonato de sódio e/ou dióxido de carbono. Além disso, muitas microalgas podem crescer heterotroficamente durante o período escuro utilizando fontes orgânicas de carbono (WEN e CHEN, 2003). Quando as células são expostas à luz, muitas microalgas podem assimilar carbono inorgânico e orgânico simultaneamente, desenvolvendo metabolismo mixotrófico (POERSCHMANN et al., 2004).

Cultivos mixotróficos, em que há adição de fontes orgânicas de carbono, melhoram significativamente o crescimento de microalgas, chegando a obter densidades celulares 3 a 10 vezes superiores as obtidas em cultivos autotróficos (BHATNAGAR et al., 2011; CID et al., 1992; BECKER e VENKATARAMAN, 1984). ANDRADE e COSTA (2007) realizaram ensaios com a microalga *Spirulina* utilizando melão como substrato orgânico e observaram que o melão foi o fator de maior influência sobre a máxima concentração de biomassa alcançada e sobre a velocidade específica máxima de crescimento. O substrato orgânico no meio de cultivo pode reduzir a perda noturna de biomassa (TORZILLO et al., 1991), que acontece devido à demanda energética celular que é suprida pela respiração.

O objetivo deste trabalho foi cultivar microalgas mixotroficamente visando estimular a síntese de biossurfactantes e selecionar as microalgas produtoras.

4.1.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.4.1 Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina* sp. LEB-18

A microalga *Spirulina* sp. LEB-18 (MORAIS et al., 2008) foi mantida e cultivada em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966), diluído com água destilada estéril a 20% v/v (ANDRADE e COSTA, 2007) e complementado com 1, 3, 5, 7 e 9 g.L⁻¹ de glicose ou melão. A adição de glicose ou melão aos cultivos foi realizada somente durante o período escuro, sendo adicionadas diariamente $\frac{1}{10}$ da concentração total (1, 3, 5, 7 ou 9 g.L⁻¹) de glicose ou melão, durante 10 d de cultivo.

Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores de 2 L tipo erlenmeyer, mantidos em estufa termostatizada a 30 °C; 41,6 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 12 h claro/escuro. A agitação das culturas foi realizada pela injeção de ar estéril com vazão específica de 0,5 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto) (COSTA et al., 2000). A concentração inicial de *Spirulina* sp. LEB-18 foi 0,15 g.L⁻¹ (RADMANN et al., 2007). A concentração de glicose foi analisada através de método enzimático glicose-oxidase (Laborlab, Campinas/Brasil). Os cultivos e análises foram realizados em duplicata.

4.1.4.2 Seleção de microalgas para produção de biossurfactantes

Micro-organismos e condições de cultivo

As microalgas utilizadas neste estudo foram *Synechococcus nidulans* LEB-25 e *Chlorella vulgaris* LEB-106 (RADMANN e COSTA, 2008), *Spirulina* sp. LEB-18 (COSTA et al., 2006a), *Chlorella minutissima* (COSTA et al., 2006b) e *Chlorella homosphaera* (RADMANN, 2007). *S. nidulans* LEB-25 e *Spirulina* sp. LEB-18 foram mantidas e cultivadas em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) e as demais em meio BG-11 (RIPPKA et al., 1979). Foram estudadas diferentes fontes de carbono (bicarbonato de sódio – autotrófico ou glicose – mixotrófico). A concentração de bicarbonato de sódio utilizada foi a mesma utilizada no meio Zarrouk ($16,8 \text{ g.L}^{-1}$) (CHEN et al., 1996) e a concentração de glicose utilizada foi a que apresentou melhor resultado de crescimento (5 g.L^{-1}), estudada anteriormente conforme descrito no item 2.1. A adição de glicose aos cultivos foi realizada somente durante o período escuro, sendo adicionadas diariamente $1/20$ (g.L^{-1}) da concentração total de glicose (5 g.L^{-1}) durante 20 d de cultivo.

Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores de 2 L tipo erlenmeyer, mantidos em estufa termostatizada a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $41,6 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 12 h claro/escuro. A agitação das culturas foi realizada pela injeção de ar estéril com vazão específica de 0,5 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto) (COSTA et al., 2000). A concentração inicial de microalga foi $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ (RADMANN et al., 2007). A concentração de glicose foi analisada através de método enzimático glicose-oxidase (Laborlab, Campinas/Brasil). Todos os ensaios e análises foram realizados em duplicata.

Determinações analíticas

Estimativa do crescimento microalgal

O crescimento da biomassa foi monitorado diariamente pela densidade ótica das culturas a 670 nm em espectrofotômetro (Femto 700 Plus, Brasil) através de curva padrão previamente construída relacionando peso seco e densidade óptica. O pH das culturas foi determinado diariamente em pHmetro digital (Quimis Q400HM, Brasil).

Foram avaliadas a concentração máxima de biomassa (X_{max} , g.L^{-1}), a produtividade máxima (P_{max} , $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) obtida segundo a equação $P = (X_t - X_0)/(t - t_0)$, onde X_t é a concentração de

biomassa (g.L^{-1}) no tempo t (d), e X_0 a concentração de biomassa (g.L^{-1}) no tempo t_0 (d) (SCHMIDELL et al., 2001); e a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max} , d^{-1}) por regressão exponencial aplicada à fase de crescimento logarítmica (BAILEY e OLLIS, 1986).

Estimativa da atividade biossurfactante

A cada 2 d, o meio (com as células) a ser analisado foi previamente tratado em banho ultrassônico (15 min) para rompimento da parede celular das microalgas estudadas e logo após foi estimada a atividade biossurfactante através da análise de tensão superficial em tensiômetro digital (Kruss Processor Tensiometer K-6, Alemanha) usando o método do anel, sendo a tensão medida com a amostra em contato com o ar (RODRIGUES et al., 2006).

4.1.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1.5.1 Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina* sp. LEB-18

A Figura 1 apresenta as curvas de crescimento celular de *Spirulina* sp. LEB-18 ao longo do tempo de cultivo com adição noturna de fonte glicose ou melaço.

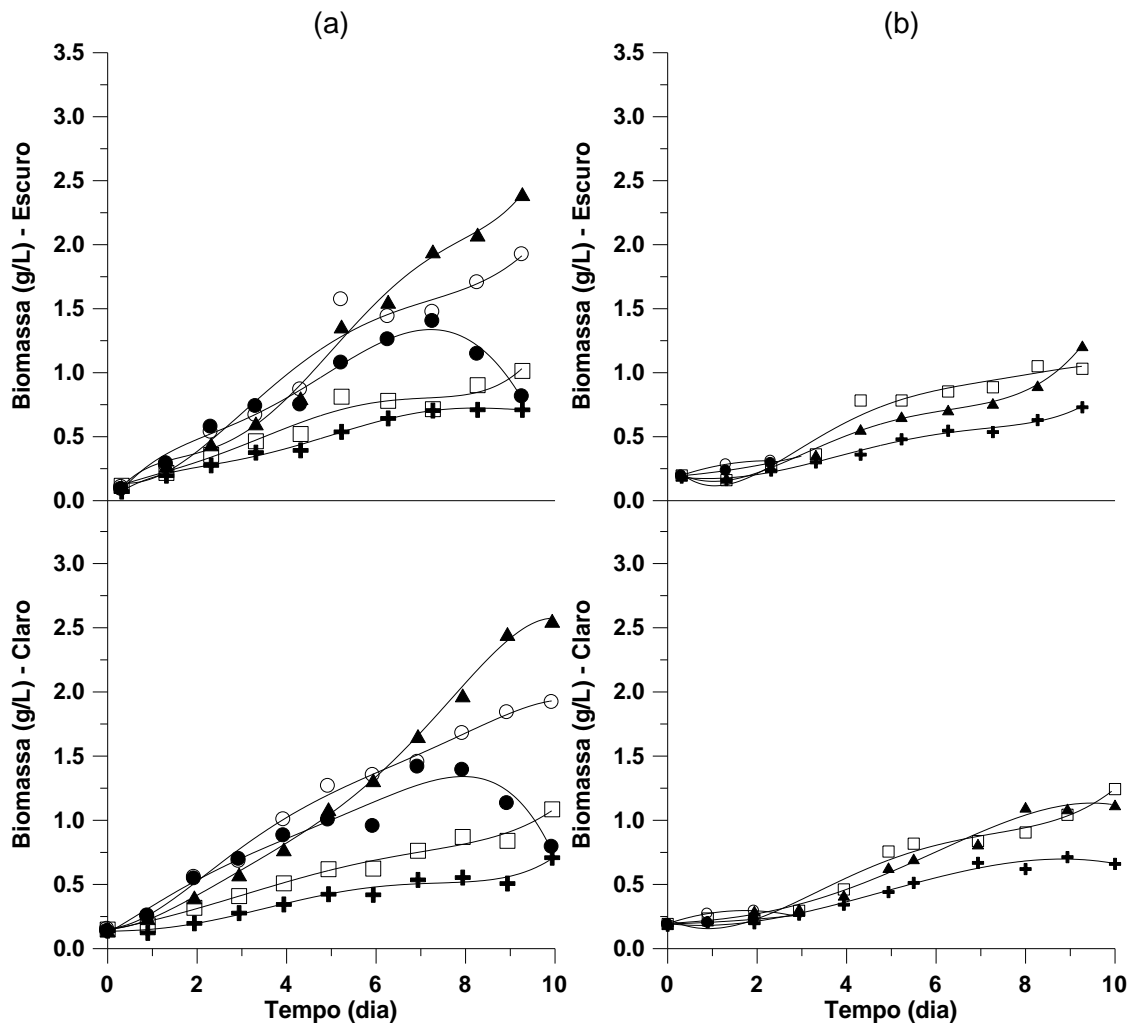


Figura 1 Produção de biomassa por *Spirulina* sp. LEB-18 cultivada em diferentes concentrações de glicose (a) e melaço (b): (+) E1 (1,0 g.L⁻¹); (□) E2 (3,0 g.L⁻¹); (▲) E3 (5,0 g.L⁻¹); (○) E4 (7,0 g.L⁻¹); (●) E5 (9,0 g.L⁻¹).

Todos os cultivos apresentaram crescimento durante 10 d, com exceção dos ensaios E4 e E5 com adição de melaço que apresentaram morte celular em 3 d. Ambos os cultivos mixotróficos apresentaram maior concentração de biomassa, comparados ao cultivo

autotrófico que atingiu máximo de $0,98 \text{ g.L}^{-1}$. CHENG e ZHANG (1997) relatam que culturas mixotróficas têm o crescimento celular limitado por baixas ou altas concentrações de carbono orgânico. Tal fato ocorreu no presente trabalho, pois as máximas velocidades específicas de crescimento foram obtidas pela microalga *Spirulina* sp. LEB-18 quando cultivada em $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de carbono orgânico. ANDRADE e COSTA (2007) investigaram o cultivo mixotrófico de *Spirulina platensis* e obtiveram em 10 d de cultivo aproximadamente $1,50 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa complementando o meio com $0,50 \text{ g.L}^{-1}$ de melação no início do cultivo. MARQUEZ et al. (1995) estudaram o cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* com adição de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose no início do cultivo, obtendo em 10 d de cultivo $2,14 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa.

As máximas produtividades ($0,27$ e $0,26 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) foram verificadas em cultivos com $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose e $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de melação, respectivamente (Tabela 1). Quando comparados ao cultivo autotrófico ($0,10 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), observa-se que a adição de fonte orgânica aos cultivos aumentou significativamente ($p < 0,001$) a produtividade máxima. Produtividade de $0,56 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ foi obtida por ANDRADE e COSTA (2007) para *Spirulina platensis* cultivada com $0,75 \text{ g.L}^{-1}$ de melação, nos 3 primeiros dias de cultivo, e após a produtividade reduziu e se manteve constante em torno de $0,12 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ao longo dos 20 dias.

Tabela 1 Concentração celular máxima (X_{max} , g.L^{-1}) produtividade máxima (P_{max} , $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) e velocidade específica máxima (μ_{max} , d^{-1}) de crescimento para os experimentos realizados.

Ensaio	S_{FOC} (g/L)	X_{max}		P_{max}		μ_{max}	
		glicose	melação	glicose	melação	glicose	melação
1	1,0	$0,71 \pm 0,10$	$0,73 \pm 0,12$	$0,08 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,00$
2	3,0	$1,09 \pm 0,09$	$1,24 \pm 0,16$	$0,13 \pm 0,00$	$0,26 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$
3	5,0	$2,55 \pm 0,21$	$1,21 \pm 0,07$	$0,27 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,00$	$0,38 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$
4	7,0	$1,92 \pm 0,15$	$0,31 \pm 0,20$	$0,27 \pm 0,00$	$0,12 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$
5	9,0	$1,53 \pm 0,05$	$0,29 \pm 0,15$	$0,25 \pm 0,00$	$0,10 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,00$	$0,02 \pm 0,01$
autotrófico	0,0	$0,98 \pm 0,00$		$0,10 \pm 0,00$		$0,20 \pm 0,00$	

S_{FOC} – concentração da fonte orgânica de carbono adicionada

As velocidades específicas máximas de crescimento foram obtidas para microalga *Spirulina* sp. LEB-18 quando cultivada com $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de fonte orgânica de carbono. Quando cultivada com glicose, a *Spirulina* sp. LEB-18 apresentou aumento de 1,9 vezes na resposta μ_{max} . Estes resultados concordam com os obtidos por CHOJNACKA e NOWORYTA (2004) que obtiveram maiores velocidades específicas de crescimento em cultivo mixotrófico comparado ao

autotrófico. No cultivo com melação houve redução na resposta de μ_{\max} , quando comparado ao cultivo autotrófico.

O uso de melação como fonte orgânica de carbono quando comparado com a glicose, apresentou resultados inferiores, mas através dos resultados apresentados, nota-se o potencial de utilização de melação como substrato orgânico no cultivo de microalgas, possibilitando a exploração de um subproduto de baixo custo.

O pH dos cultivos se mantiveram entre 9,5 e 10,5, que segundo PELIZER et al. (2003) é o intervalo ótimo para o crescimento da microalga. Valores de pH acima de 9,5 são indispensáveis para evitar a contaminação por outras microalgas (BELAY, 1997).

4.1.5.2 Seleção de microalgas para produção de biossurfactantes

A Figura 2 apresenta o crescimento das microalgas estudadas ao longo de 20 d na presença de bicarbonato de sódio ($16,8 \text{ g.L}^{-1}$) ou glicose ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$) como fontes de carbono. Como nos ensaios realizados anteriormente com *Spirulina* sp. LEB-18, a glicose foi adicionada durante o período escuro, pois segundo TORZILLO et al. (1991), durante a fase escura, ocorre perda de biomassa, devido a demanda energética celular que é suprida pela respiração. A adição noturna de uma fonte orgânica de carbono (glicose) minimizaria tal perda.

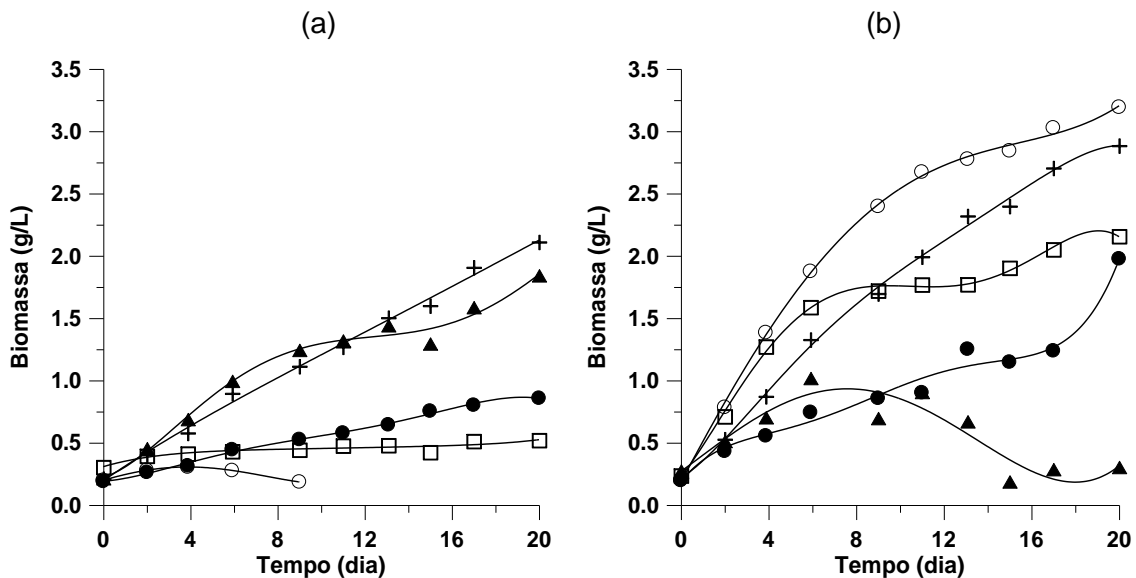


Figura 2 Curva de crescimento para as microalgas *S. nidulans* LEB-25 (+), *C. minutissima* LEB-108 (□), *C. vulgaris* LEB-106 (▲), *C. homosphaera* (○), *Spirulina* sp. LEB-18 (●): (a) cultivos com bicarbonato de sódio ($16,8 \text{ g.L}^{-1}$) e (b) cultivos com glicose (5 g.L^{-1}).

Quando comparada com os ensaios realizados anteriormente (Figura 1), a microalga *Spirulina* sp. LEB-18 apresentou menor crescimento com a mesma concentração de glicose ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$), mas em condições diferentes de adição. Nestes últimos ensaios (Figura 2), a adição de glicose foi realizada também diariamente durante a fase escura. Foi adicionado $\frac{1}{20}$ da concentração total de glicose, durante 20 d de cultivo, o que pode ter ocasionado um crescimento mais lento em relação ao cultivo anterior em que foi adicionada maior quantidade ($\frac{1}{10}$) de glicose diariamente, pois o cultivo foi realizado em menor tempo (10 d). A glicose foi adicionada em partes (diariamente), pois com a adição da concentração total ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$) no início dos cultivos, ocorreu precipitação, diminuindo a disponibilidade de nutrientes para a microalga.

Diariamente, antes da adição de glicose aos cultivos, foi realizada análise da concentração da mesma no meio, verificando-se que esta era totalmente consumida pelas microalgas durante a fase clara. Assim a adição de maior quantidade de glicose no meio de cultivo poderá estimular o crescimento celular, uma vez que toda glicose adicionada diariamente era consumida.

CHEN et al. (1996) utilizando diferentes fontes de carbono (bicarbonato de sódio, glicose ou acetato) no cultivo de *Spirulina platensis*, observaram que a cianofícea apresentou melhor crescimento quando foi utilizada glicose ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$) como fonte de carbono, alcançando a $2,66 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa, resultados estes semelhantes aos encontrados no presente trabalho para todas microalgas estudadas.

Maiores resultados de concentração de biomassa máxima foram obtidos para as microalgas *C. homosphaera* ($3,19 \text{ g.L}^{-1}$) e *S. nidulans* LEB-25 ($2,88 \text{ g.L}^{-1}$) cultivadas com glicose. A microalga *C. minutissima* LEB-108 ($2,16 \text{ g.L}^{-1}$) apresentou crescimento semelhante ao estudo realizado por BHATNAGAR et al. (2011), quando cultivaram as microalgas *C. minutissima* e *Scenedesmus bijuga* com 1% de glicose e obtiveram $2,10 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa em 7 d de cultivo.

Tabela 2 Concentração celular máxima (X_{max} , $g.L^{-1}$), produtividade máxima (P_{max} , $g.L^{-1}.d^{-1}$), velocidade específica máxima (μ_{max} , d^{-1}) de crescimento e tensão superficial mínima (TS_{min} , $mN.m^{-1}$) para as microalgas *S. nidulans* LEB-25 (Sy), *C. minutissima* LEB-108 (CM), *C. vulgaris* LEB-106 (CV), *C. homosphaera* (CH) e *Spirulina* sp. LEB-18 (Sp)

Microalga	X_{max}		P_{max}		μ_{max}	
	NaHCO ₃	glicose	NaHCO ₃	glicose	NaHCO ₃	glicose
Sy	2,11±0,52	2,88±0,12	0,156±0,062	0,223±0,008	0,089±0,034	0,138±0,006
CM	0,52±0,00	2,16±0,15	0,045±0,019	0,299±0,052	0,009±0,009	0,223±0,030
CV	1,84±0,29	1,02±0,23	0,150±0,019	0,154±0,085	0,114±0,011	0,129±0,078
CH	0,31±0,00	3,19±0,08	0,060±0,021	0,320±0,003	0,027±0,003	0,031±0,017
Sp.	1,01±0,07	1,97±0,14	0,063±0,030	0,246±0,180	0,028±0,001	0,158±0,004

As melhores respostas cinéticas de crescimento (Tabela 2) foram obtidas, para todas as microalgas estudadas, quando cultivadas mixotroficamente. Estes resultados concordam com aqueles de CHOJNACKA & NOWORYTA (2004) que obtiveram maiores velocidades específicas de crescimento em cultivo mixotrófico comparado ao autotrófico.

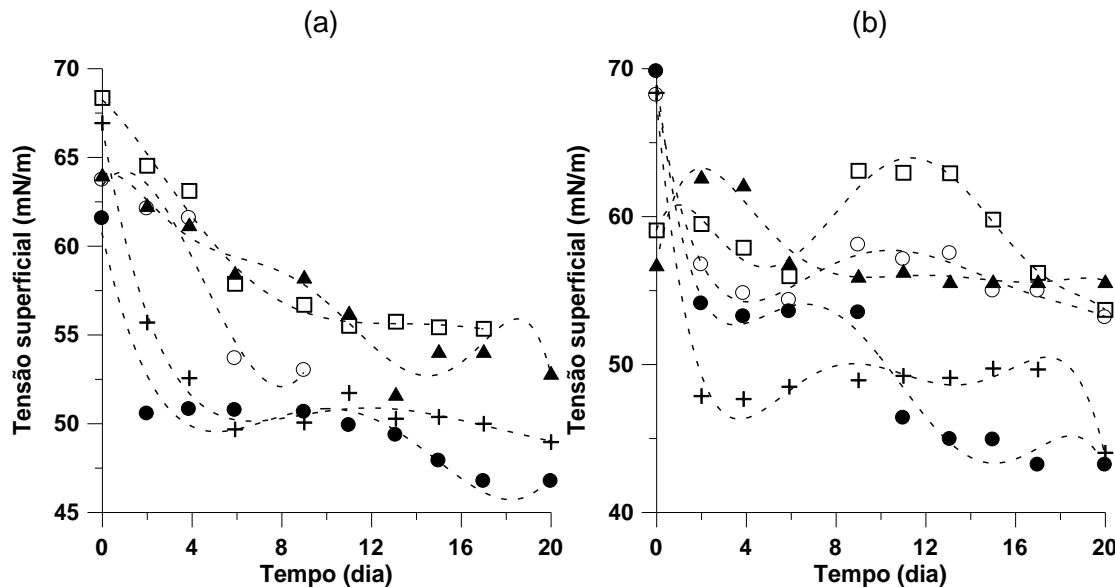


Figura 3 Tensão superficial ao longo do tempo para microalgas *S. nidulans* LEB-25 (+), *C. minutissima* LEB-108 (□), *C. vulgaris* LEB-106 (▲), *C. homosphaera* (○), *Spirulina* sp. LEB-18 (●): (a) cultivos com bicarbonato de sódio ($16,8 g.L^{-1}$) e (b) cultivos com glicose ($5 g.L^{-1}$).

As microalgas *S. nidulans* LEB-25 e *Spirulina* sp. LEB-18 apresentaram redução da tensão superficial dos meios de 70 para 43 mN.m⁻¹ (Figura 3), indicando a produção de biossurfactantes pelas microalgas estudadas utilizando glicose como fonte de carbono. A fonte de carbono apresenta grande importância na produção de biossurfactantes, influenciando na síntese do biossurfactantes por indução ou repressão. Segundo CAMEOTRA e MAKKAR (1998) e KIM et al. (1997), as fontes de carbono utilizadas para produção de biossurfactantes podem ser divididas em: carboidratos, hidrocarbonetos e óleos vegetais. KIM et al. (1997) verificaram que a cultura de *Bacillus subtilis* C9 apresentou alto rendimento de biomassa, utilizando 40 g.L⁻¹ de glicose como substrato. A tensão superficial foi reduzida de 72,8 para 28,2 mN.m⁻¹. PINTO (2008) utilizou 40 g.L⁻¹ de glicose no meio de cultivo da bactéria *Corynebacterium aquaticum* e obteve concentração de biomassa de 1,98 g.L⁻¹ e redução na tensão superficial de 70 para 28,8 mN.m⁻¹.

ILORI et al. (2005) estudaram o efeito de diferentes fontes adicionais de carbono, e dentre elas a glicose, na produção de biossurfactantes por *Aeromonas* spp., ocorrendo maior produção com glicose no quarto dia de cultivo. Segundo CAVALERO e COOPER (2003) e HOMMEL et al. (1994) os substratos solúveis em água, como a glicose, são primeiramente utilizados no metabolismo celular para a síntese da parcela hidrofílica da molécula do biossurfactantes, enquanto os substratos lipofílicos são utilizados para a produção da porção lipofílica, sendo incorporados diretamente na molécula do biossurfactantes.

4.1.6 CONCLUSÕES

Comparado ao cultivo autotrófico da *Spirulina* sp. LEB-18, o cultivo mixotrófico com adição noturna de fonte orgânica de carbono aumentou 2,6 vezes a concentração final de biomassa. Maior concentração de biomassa (2,55 g.L⁻¹) foi obtida com adição de 5,0 g.L⁻¹ de glicose ao cultivo.

O mesmo comportamento foi observado quando se estudou cultivos autotróficos e mixotróficos com as microalgas *S. nidulans* LEB-25, *C. vulgaris* LEB-106, *C. minutissima* LEB-108 e *C. homosphaera*. A redução da tensão superficial dos meios foi de 70 para 43 mN.m⁻¹, indicando a produção de biossurfactantes pelas microalgas estudadas utilizando glicose como fonte de carbono.

Os resultados demonstram o potencial da fonte orgânica de carbono como forma de estimular o crescimento e a produção de biossurfactantes, além do potencial da utilização de

melaço como substrato orgânico no cultivo de microalgas, possibilitando a exploração de um subproduto de baixo custo.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

4.1.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of Microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*, 264, 130-134, 2007.

BHATNAGAR, A.; CHINNASAMY, S.; SINGH, M.; DAS, K. C. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*, 2011. *No prelo*.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2ª ed. Singapore: McGraw-Hill, 1996.

BANAT, I. N.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. and Biotechnol*, 53, 495-508, 2000.

BARTH, G.; GAILLARD, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*, 19, 219-237, 1997.

BECKER, E. W.; VENKATARAMAN, L. V. Production and utilization of the blue-green alga *Spirulina* in Ind. *Biomass*, 4, 105-125, 1984.

BELAY, A. Mass culture of *Spirulina* outdoors – The Earthrise farms experience. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (Arthorspira) Phycology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis. (1997)

BIGOGNO, C.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; COHEN, Z. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry*, 60, 497–503, 2002.

- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152, 41-52, 1999.
- BOROWITZKA, M. A. Algal growth media and sources of culture. In: BOROWITZKA, M. A. e BOROWITZKA, L. J., eds, *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, 456-465, 1988.
- BROWN, L. M. Uptake of carbon dioxide from flue gas by microalgae. *Energy Convers. Mgmt.*, 37, 1363-136, 1996.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 5, 520-529, 1998.
- CAVALERO, D. A.; COOPER, D. G. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC22214. *Journal of Biotechnology*, 103, 31-41, 2003.
- CEVC, G. *Phospholipids – Handbook*. Marcel Dekker, Inc. New York, EUA. 1993.
- CHAUTON, M. S.; STORSETH, T. R.; KRANE, J. Analysis of whole cells of *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae), and comparison with analysis of lipophilic extracts. *Journal of Phycology*, 40, 611-618, 2004.
- CHEN, F.; ZHANG, G. Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. *Enzyme and Microbial Technology*, 20, 221-224, 1997.
- CHEN, F.; ZHANG, Y.; GUO, S. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. *Biotchnology Letters*, 18, 5, 603-608, 1996.
- CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. Growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 461-465, 2004.
- CID, A.; ABALDE, J.; HERRERO, C. High yield mixotrophic cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher (Prasinophyceae). *Journal of Applied Phycology*, 4, 31-37, 1992.
- COSTA, J. A. V.; LINDE, G. A.; ATALA, D. I. P.; MIBIELLI, G. M.; ARRIECHE, L.; KRÜGER, R. T. Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 16, 15-18, 2000.

- COSTA, J. A. V.; RADMANN, E. M.; CERQUEIRA, V. S.; SANTOS, G. C.; CALHEIROS, M. N. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 17, 4, 429-436, 2006.
- DESAI, J. D.; BANAT I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Rev*, 61, 47-64, 1997.
- HOMMEL, R. K.; WEBER, L.; WISS, A.; HAFERBURG, D.; KLEBER, H. P. Production of sophorose lipids by *Candida* (Torulopsis) *apicola* grown on glucose. *Journal of Biotechnology*, 33, 147-155, 1994.
- ILORI, M. O.; AMOBI, C. J.; ODOCHA, A. C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. *Chemosphere*, 61, 985-992, 2005.
- KAPPELI, O.; FINNERTY, W. R. Partition of Alkane by an Extracellular Vesicle Derived from Hexadecane-Grown *Acinetobacter*. *Journal of Bacteriology*, 140, 2, 707-712, 1979.
- KIM, H. S.; YOON, B. D.; LEE, C. H.; SUH, H. H.; OH, H.M.; KAYSURAGI, T.; TANI, Y. Production and Properties of a Lipopeptide Biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84, 1, 41-46, 1997.
- KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. *Pure & Appl. Chern.*, 64, 11, 1731-1737, 1992.
- LANG, S. Biological Amphiphiles (microbial biosurfactants). *Current Opinion I Colloid & Interface Science*, 7, 12-20, 2002.
- RODOLFI, L.; CHINI ZITTELLI, G.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 1, 100-112, 2009.
- MARQUEZ, F. J.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Enhancement of Biomass and Pigment Production During Growth of *Spirulina platensis* in Mixotrophic Culture, *Journal Chemistry technology and Biotechnology*, 62, 159-164, 1995.
- MORAIS, M, G.; COSTA, J. A. V. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 129, 3, 439-445, 2007.

- MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Biofixation of CO₂ from synthetic combustion gas using cultivated microalgae in three-stage serial tubular photobioreactors. *Zeitschrift für Naturforschung*, 2011. No prelo.
- MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. *Z. Naturforsch.* 63c, 144–150, 2008.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*. 25, 5, 772-776, 2002.
- PELIZER, L. H.; DANESI, E. D.; RANGEL, C. O.; SASSANO, C. E. N.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S.; MORAES, I. O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. *Journal of Food Engineering*, 56, 371-375, 2003.
- POERSCHMANN, J.; SPIJKERMAN, E.; LANGER, U. Fatty acid patterns in *Clamydomonas* sp. as a marker for nutritional regimes and temperature under extremely acidic conditions. *Microb. Ecol.*, 48, 78–89, 2004.
- RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. *Química Nova*, 31, 7, 1609-1612, 2008.
- RADMANN, E. M.; REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open Raceway ponds. *Aquaculture*, v. 265, p. 118-126, 2007.
- RODRIGUES, L.; MOLDES, A.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. *Biochemical Engineering Journal*, 28, 109-116, 2006.
- ROSA, A. P. C.; CARVALHO, L. F.; GOLDBECK, L.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. *Energy Conversion and Management*, 2011. No prelo
- SZUHAJ, B. F. Lecithins sources, manufacture & uses. *American Oil Chemists' Society.*, 74-76, 1989.
- TORZILLO, G.; SACCHI, A.; MATERASI, R. Temperature as an important factor affecting productivity and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. *Bioresource Technology*, 38, 95 – 100, 1991.
- TREDICI, M. R. Photobiology of microalgae mass culture. *Biofuels*, 1 (1), 143-162, 2010.

WEN, Z. Y.; CHEN, F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*, 4, 21, 273-94, 2003.

XUE, C.; HU, Y.; SAITO, H.; ZHANG, Z.; LI, Z.; CAI, Y.; OU, C.; LIN, H.; IMBS, A. B. Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*, 77, 9–13, 2002.

ZARROUK, C. Contribution a Letude Dune Cyanophyce, Influence de Divers Facteurs physiques et Chimiques sur la Croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* geitler. *Ph.D. Thesis*, University of Paris, 1966.

4.2 SELEÇÃO DE MICROALGAS PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

Elisângela M. Radmann¹, Natascia Biondi², Mario R. Tredici², Jorge A. V. Costa^{1*}

¹ Laboratório de Engenharia Bioquímica, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Caixa Postal 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil. Fax: +55-53-3233 8745. E-mail: jorge@pq.cnpq.br

² Departamento de Biotecnologia Agrária, Università degli Studi di Firenze, P.le delle Cascine 24, 50144 Firenze, Italia.

4.2.1 RESUMO

O cultivo de microalgas tem sido focado quanto à produção de biomassa tanto para uso na elaboração de alimentos quanto para a obtenção de compostos bioativos. Neste trabalho foi estudado o potencial de produção de biossurfactantes pelas microalgas *Tetraselmis suecica* OR, *Scenedesmus* sp. 3PAV3 e *Chlorella* sp. PROD1 utilizando diferentes métodos de extração. As microalgas foram cultivadas em fotobiorreatores do tipo *Green Wall Panel* (GWP) e *Annular Column* (AC) e em condições *indoor* e *outdoor*. Os maiores valores de AE óleo/água dos extratos foram obtidos quando utilizados metanol e etanol como solvente. A microalga *Scenedesmus* sp. 3PAV3 apresentou valor de AE óleo/água superior (339,8 UE.g⁻¹) ao encontrado para o emulsificante comercial lecitina de soja (257 UE.g⁻¹). Os menores valores de tensões superficiais variaram de 27,4 a 31,2 m.N.m⁻¹ para as microalgas estudadas. Considerando as propriedades dos biossurfactantes, com este trabalho, confirma-se a aplicação em diversos processos industriais dos biossurfactantes produzidos pelas microalgas.

Palavras-chave: biossurfactantes, emulsificante, estabilizante, microalgas.

4.2.2 ABSTRACT

The cultivation of microalgae has been focused on the production of biomass for use not only in food preparation, but also for obtaining bioactive compounds. This study investigated the potential of biosurfactant production by microalgae *Tetraselmis suecica* OR, *Scenedesmus* sp. 3PAV3 e *Chlorella* sp. PROD1 using different extraction methods. The microalgae were grown in *Green Wall Panel* photobioreactor (GWP) and *Annular Column* (AC) and indoor and outdoor conditions. The highest values of EA oil/water extracts were obtained when methanol and ethanol were use as solvent. The microalgae *Scenedesmus* sp. 3PAV3 showed value of EA oil/water higher (339.8 UE g⁻¹) to that found for the commercial emulsifier soy lecithin (257 UE g⁻¹). The lower values of surface tensions ranging from 27.4 to 31.2 mN m⁻¹ for the microalgae Studied. Considering the properties of biosurfactants, with this work, it is confirmed its possible application in various industrial processes.

Keywords: biosurfactants, emulsifier, stabilizer, microalgae.

4.2.3 INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são compostos de superfície ativa, produzidos na superfície da célula microbiana ou excretados extracelularmente, que reduzem tensões superficiais e interfaciais (VAN DYKE et al., 1991). O aumento da preocupação ambiental tem colocado os biossurfactantes como alternativas promissoras, por apresentarem vantagens de baixa toxicidade, biodegradabilidade e propriedades biológicas, frente aos surfactantes sintéticos, que na sua maioria são derivados de petróleo.

Na indústria de alimentos os biossurfactantes podem ser aplicados como emulsificante e como um ingrediente funcional (SINGH et al., 2007). A emulsificação tem um papel importante na formação da consistência e textura, bem como na dispersão de fase e na solubilização de aromas (LANG e WAGNER, 1993). Os biossurfactantes são utilizados como emulsificantes no processamento de matérias-primas. Os agentes tensoativos encontram aplicação em panificação e produtos derivados de carne, onde influenciam as características reológicas da farinha e a emulsificação de gorduras (BARROS et al., 2007). O interesse em identificar e isolar novos micro-organismos produtores de moléculas tensoativas, que apresentem características surfactantes, vem aumentando nas últimas décadas. A produção de biossurfactantes, segundo o estado da arte, pode ser realizada por bactérias, fungos e leveduras (NITSCHKE e PASTORE, 2004; BOGNOLO, 1999; KAPPELI e FINNERTY, 1979).

Com este trabalho pretendeu-se estudar as microalgas, com foco na produção de biossurfactantes, já que as microalgas são grandes produtoras de compostos como glicolípidios, fosfolípidios e lípidios neutros (RODOLFI et al. 2009; CHAUTON et al., 2004; XUE et al., 2002; BIGOGNO et al., 2002; CEVC, 1993; KOSARIC, 1992; SZUHAJ, 1989; BOROWTZKA, 1988), que por sua vez podem ser biossurfactantes (DESAI e BANAT, 1997). Além disso, muitas microalgas são GRAS (*Generally Recognized as Safe*), não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, o que permite sua utilização para aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica (BARTH e GAILLARD, 1997).

Com o desenvolvimento de processos biotecnológicos utilizando biomassa microalgal e suas diversas aplicabilidades no campo biotecnológico, faz necessária a utilização de técnicas de extração eficientes, que auxiliem na obtenção de produtos com alto grau de pureza e conseqüentemente de melhor reprodutibilidade analítica.

O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial e selecionar microalgas para produção de biossurfactantes.

4.2.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.4.1 Micro-organismos e condições de cultivo

Nannochloropsis sp. FM – M24 e *Tetraselmis suecica* OR da coleção de cultura do Departamento de Biotecnologia Agrária da Università degli Studi di Firenze (Itália) foram cultivadas em condições *outdoor* em *Green Wall Panel* – GWP (Figura 1a) (TREDICI e RODOLFI, 2004), em meio F (GUILLARD e RYTHER, 1962). *Nannochloropsis* sp. FM – M24 foi cultivada a baixas temperaturas no inverno e *Tetraselmis suecica* OR foi cultivada em temperaturas mais elevadas (não ultrapassando 28°C) no verão.

Scenedesmus sp. 3PAV3 e *Chlorella* sp. PROD1 também da coleção de cultura do Departamento de Biotecnologia Agrária da Università degli Studi di Firenze (Itália) foram cultivadas fotobiorreator do tipo *Annular Column* (AC 90 L – Figura 1b) e *Annular Column* (AC 6 L – Figura 1c), em meio BG-11 (RIPPKA et al., 1979). Ambas as microalgas foram cultivadas em condições *indoor*.

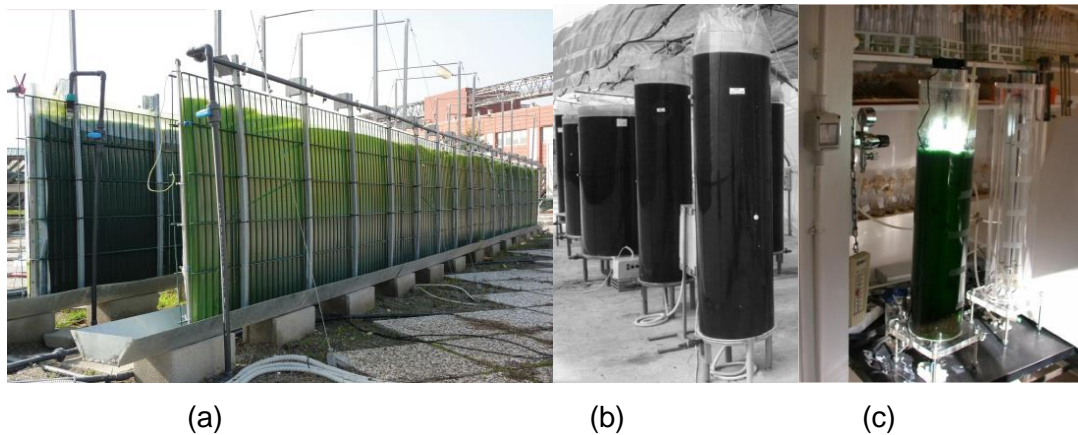


Figura 1 Fotobiorreatores para produção de microalgas (a) *Green Wall Panel* (GWP); (b) *Annular Column* de 90 L (AC 90); (c) *Annular Column* de 6 L (AC 6)

4.2.4.2 Estudo da extração dos biossurfactantes das microalgas

Foram estudados diferentes tipos de extrações dos biossurfactantes das microalgas *Nannochloropsis* sp. FM – M24, *T. suecica* OR, *Scenedesmus* sp. 3PAV3 e *Chlorella* sp. PROD1, utilizando a mesma proporção de 0,1:7,5 (0,1 g de biomassa seca e 7,5 mL de água)

em todas extrações estudadas. Os extratos obtidos foram utilizados para as análises de atividade emulsificante, tensão superficial e tensão interfacial.

4.2.4.2.1 Extrações com água (Extratos I 50 e I 90)

A extração dos biossurfactantes foi realizada com água destilada a 50 ou 90 °C. As amostras foram submetidas ao rompimento da parede celular em sonda ultrassônica (Sonics & Materials, Inc., Newtown/USA) e posteriormente à agitação a 160 rpm e 50 °C durante 30 min, sendo em seguida centrifugada. Desta etapa foram obtidos 2 extratos (50 e 90 °C). Este método foi estudado para *Nannochloropsis* sp. FM – M24 e *T. suecica* OR.

4.2.4.2.2 Extração com clorofórmio e metanol (Extratos II amb, II 50 e II 90)

Nesta etapa a extração foi realizada com clorofórmio:metanol (1:2) (BLIGH e DYER, 1959) com quartzo e posteriormente submetido ao rompimento da parede celular em agitador de tubos (5 min) e banho ultrassônico (20 min), sendo seguida de centrifugação e evaporação. O extrato foi resuspenso em água em diferentes temperaturas (ambiente, 50 e 90 °C), obtendo-se 3 extratos diferentes. Este método foi estudado para *Nannochloropsis* sp. FM – M24 e *T. suecica* OR.

4.2.4.2.3 Extração com clorofórmio e metanol (com separação de fases – Extrato III)

Na primeira fase a extração foi realizada com clorofórmio: metanol (1:2) (BLIGHT & DYER, 1959) com quartzo e posteriormente submetido ao rompimento da parede celular em agitador de tubos (5 min) e banho ultrassônico (20 min), sendo seguida de centrifugação e após o sobrenadante passou pelo processo de separação de fases (lavagem) com água e clorofórmio, permanecendo somente a parte lipídica. Em seguida o extrato foi evaporado e resuspenso em água à temperatura ambiente. Este método foi estudado para *Nannochloropsis* sp. FM – M24 e *T. suecica* OR.

Os demais métodos de extração citados abaixo, foram estudados para as microalgas *Nannochloropsis* sp. FM – M24, *T. suecica* OR, *Scenedesmus* sp. 3PAV3 e *Chlorella* sp. PROD1.

4.2.4.2.4 Extração sequencial I (Extrato IV H₂O, IV etanol, IV etil acetato, IV clorofórmio)

A extração foi realizada sequencialmente, utilizando inicialmente um solvente hidrófilo até um lipófilo (água, etanol, etil acetato, clorofórmio). Primeiro houve o rompimento da parede celular da biomassa seca das microalgas em sonda ultrassônica com água, seguido de agitação em agitador magnético durante 5 h. Logo após passou por centrifugação (Extrato IV H₂O) e ao *pellet* adicionou etanol com posterior agitação (5 h), centrifugação e evaporação com resuspensão em água (Extrato IV etanol). Em seguida ao *pellet* foi adicionado etil acetato, submetido a agitação por 5 h, centrifugação e evaporação com resuspensão em água (Extrato IV etil acetato). Ao *pellet* foi adicionado clorofórmio submetido a agitação (5 h), filtração e evaporação com resuspensão em água (Extrato IV clorofórmio).

4.2.4.2.5 Extração sequencial II (Extrato V clorofórmio, V acetona, V metanol e V H₂O)

A extração foi realizada sequencialmente, utilizando inicialmente um solvente lipófilo até um hidrófilo (clorofórmio, acetona, metanol, água). Na primeira fase a extração foi realizada com clorofórmio e com quartzo em agitador de tubos (5 min) e banho ultrassônico (20 min), para rompimento da parede celular, seguido de agitação em agitador magnético durante 5 h. Logo após passou por filtração e evaporação com resuspensão em água (1º extrato) e ao *pellet* adicionou acetona com posterior agitação (5 h), centrifugação e evaporação com resuspensão em água (2º extrato). Em seguida ao *pellet* foi adicionado metanol, submetido a agitação (5 h), centrifugação e evaporação com resuspensão em água (3º extrato). Ao *pellet* foi adicionado água submetido a agitação (5 h) e centrifugação (4º extrato).

4.2.4.2.6 Extração com etanol (Extrato VI)

A extração foi realizada com etanol e quartzo em agitador de tubos (5 min) e banho ultrassônico (20 min), para rompimento da parede celular, seguido de agitação em agitador magnético durante 5 h. Logo após passou por centrifugação e evaporação com resuspensão em água.

4.2.4.2.7 Extração com metanol (Extrato VII)

A extração foi realizada com metanol e quartzo em agitador de tubos (5 min) e banho ultrassônico (20 min), para rompimento da parede celular, seguido de agitação em agitador magnético durante 5 h, centrifugação e evaporação com resuspensão em água.

4.2.4.2.8 Extração com clorofórmio (Extrato VIII)

A extração foi realizada com clorofórmio e quartzo em agitador de tubos (5 min) e banho ultrassônico (20 min), para rompimento da parede celular, seguido de agitação em agitador magnético durante 5 h, centrifugação e evaporação com resuspensão em água.

4.2.4.2.9 Extração com água (Extrato IX)

A extração foi realizada com água em sonda ultrassônica (20 min), para rompimento da parede celular, seguido de agitação em agitador magnético durante 5 h e centrifugação.

4.2.4.3 Caracterização dos extratos

Para caracterização dos extratos obtidos, foram realizadas as análises de clorofila (LORENZEN, 1967; JEFFREY e HUMPHREY, 1965), feopigmentos, carotenóides (PARSONS e STRICKLAND, 1963), proteína (LOWRY et al, 1951), carboidratos (DUBOIS et al, 1956), lipídios (MARSH e WEINSTEIN, 1966) e fosfolipídios (STEWART, 1980).

4.2.4.4 Estimativa da atividade biossurfactante

A estimativa da atividade biossurfactante foi realizada através das atividades emulsificantes óleo em água e água em óleo e através da medida das tensões superficial.

4.2.4.4.1 Atividades emulsificantes óleo em água e água em óleo

Foi realizada uma análise de atividade emulsificante óleo/água com diferentes óleos, verificando àquele que melhor se ajustava ao método. Foram testados os óleos de soja, girassol, amendoim, milho e óleo lubrificante. Os óleos que melhor se ajustaram ao método

foram os óleos de soja (96%) e de girassol (97%), apresentando transmitância próxima de 100%. As análises de atividade emulsificante foram realizadas em sextuplicata.

As atividades emulsificantes óleo em água e água em óleo foram determinadas utilizando-se a proporção de 2,1:1,4 (água:extrato) e 2 mL de óleo de soja ou girassol. A mistura foi agitada em agitador vortex a 700 rpm por 1 min.

Após 60 min de repouso foi medida a transmitância do meio emulsificado óleo/água em espectrofotômetro (Varian, Mulgrave/Austrália) a 610 nm (JOHNSON et al., 1992), passando-se este valor para absorbância, e diminuindo-se da absorbância do branco (3,5 ml de água destilada e 2 ml de óleo de soja ou girassol), obtida a partir da leitura da amostra diluída. A atividade emulsificante óleo em água foi obtida através da Equação 1.

$$AE_{(O/A)}=(Abs.D)/((m.(1-U)) \quad (1)$$

Após 24 h de repouso foi realizada leitura da altura da emulsão água/óleo formada e da altura total (altura da emulsão mais altura da camada remanescente de óleo) (BRODERICK & COONEY, 1982), obtendo-se a atividade emulsificante água em óleo de acordo com a Equação 2. O branco foi preparado misturando-se 3,5: 2 (água: óleo) mL, procedendo da mesma forma que para a amostra.

$$AE_{(A/O)}=(E.D)/((m.(1-U)) \quad (2)$$

Onde:

$AE_{O/A}$ = atividade emulsificante óleo/água ($UE.g^{-1}$);

$AE_{A/O}$ = atividade emulsificante água/óleo ($UE.g^{-1}$);

Abs = absorbância da emulsão óleo/água;

D = diluição da amostra em água;

m = massa da amostra úmida (g);

U = umidade do meio;

E = relação centesimal entre a altura da emulsão e a altura total.

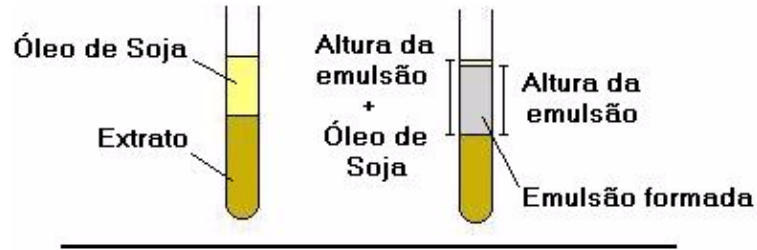


Figura 2 Representação esquemática do ensaio da atividade emulsificante
 Fonte: MARTINS (2005)

A atividade emulsificante óleo em água foi definida como a quantidade de biossurfactantes necessário para aumentar a absorvância em 1,0 a 610 nm. A atividade emulsificante água em óleo, como a quantidade de biossurfactantes necessário para manter a emulsão estável por 24 h (MARTINS et al. 2008).

4.2.4.4.2 Tensão superficial

A análise de tensão superficial foi realizada em tensiômetro (Kruss Processor Tensiometer K-6, Alemanha) usando o método do anel, sendo a tensão medida com a amostra em contato com o ar (RODRIGUES et al., 2006). Neste método, um recipiente contendo a amostra a ser analisada é suspenso até que o contato com a superfície do anel seja registrado. O contato da amostra com o anel é desfeito, de maneira que o filme líquido produzido abaixo do anel é alongado, sendo determinada a força máxima necessária para a extensão do filme, obtendo-se a tensão superficial (RODRIGUES et al., 2006). A tensão superficial foi medida com a amostra em contato com o ar, e a tensão interfacial com a amostra em contado com hexadecano.

4.2.4.5 Seleção da microalga produtora de biossurfactante

A microalga com potencial de produção de biossurfactante foi selecionada comparando os menores valores de tensões superficiais e os maiores valores das atividades emulsificantes encontrados. As respostas de atividade emulsificante foram correlacionadas com a composição química dos extratos, a fim de estimar o tipo de biossurfactantes presente nas microalgas estudadas.

4.2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram estudados todos os métodos de extração citados anteriormente no item 3.2.4.2, para as microalgas *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 e *T. suecica* OR, sendo nesta fase inicial, selecionados os métodos que apresentaram melhores resultados com relação às respostas de atividade emulsificantes, conforme apresentados na Tabela 1.

Para as análises de atividade emulsificante óleo em água (AE o/a) foram utilizados os óleos de soja e girassol, selecionados anteriormente, conforme citado em 3.2.4.4.1.

Tabela 1 Resultados de atividade emulsificante óleo/água (UE.g⁻¹) para as microalgas *Nannochloropsis* F&M-M24 e *T. suecica* OR

Extrato	<i>Nannochloropsis</i> F&M-M24		<i>T. suecica</i> OR	
	Óleo de soja	Óleo de girassol	Óleo de soja	Óleo de girassol
I 50	35,7±12,0	42,7±0,4	46,7±3,7	44,5±2,0
I 90	35,1±12,8	45,6±0,9	35,8±2,2	31,3±1,5
II amb	81,5±4,3	66,2±7,6	38,9±2,4	38,6±1,2
II 50	53,0±9,6	46,9±3,1	42,4±2,0	43,0±2,2
II 90	59,3±2,6	61,6±11,1	37,4±5,7	36,8±1,0
III	62,4±4,7	59,5±8,5	24,9±3,4	21,8±2,5
IV H ₂ O	47,8±7,2	60,5±1,3	175,2±7,0	166,0±6,9
IV etanol	80,2±5,2	74,0±1,4	32,3±2,9	26,8±1,2
IV etil acetato	1,5±0,2	3,1±0,2	3,3±0,3	3,1±0,0
IV clorofórmio	6,4±1,0	4,1±0,8	1,8±0,5	2,6±0,0
V clorofórmio	28,3±3,7	40,1±6,4	30,8±3,3	28,6±2,5
V acetona	10,8±1,6	6,7±1,6	1,5±0,3	0,5±0,1
V metanol	42,4±12,1	45,3±4,4	4,9±0,8	4,5±1,0
V H ₂ O	5,7±1,6	4,2±0,8	4,1±0,8	3,5±0,8
VI	136,6±12,9	119,6±8,3	50,8±2,6	44,7±4,4
VII	75,4±5,4	69,2±11,9	44,5±6,4	32,1±11,6
VIII	65,8±11,3	51,9±8,3	77,5±7,8	51,5±9,4
IX	107,2±12,3	80,4±15,7	133,9±7,2	103,8±9,8

A partir dos resultados apresentados na Tabela 1 observa-se que menores valores de AE o/a foram encontrados para os primeiros extratos obtidos (I, II e III). Por isso, estes não

foram estudados para as demais microalgas *Scenedesmus* sp. 3PAV3 e *Chlorella* sp. PROD1, sendo então estudadas as extrações IV, V, VI, VII, VIII e IX, conforme Tabela 2.

Tabela 2 Resultados de atividade emulsificante óleo/água (UE.g⁻¹) para as microalgas *Scenedesmus* sp. 3PAV3 e *Chlorella* sp. PROD1

Extrato	<i>Scenedesmus</i> sp. 3PAV3		<i>Chlorella</i> sp. PROD1	
	Óleo de soja	Óleo de girassol	Óleo de soja	Óleo de girassol
IV H ₂ O	61,8±10,0	61,7±8,5	85,8±3,8	94,8±10,2
IV etanol	7,7±0,3	7,8±1,0	90,1±4,8	85,6±6,5
IV etil acetato	2,6±0,5	2,2±0,3	3,6±0,3	3,9±0,6
IV clorofórmio	3,8±0,5	0,3±0,2	0,9±0,3	0,4±0,1
V clorofórmio	25,8±1,5	9,8±1,8	75,0±5,1	59,7±6,1
V acetona	33,9±3,2	25,3±3,8	3,9±0,6	2,8±0,3
V metanol	30,1±1,3	14,2±2,5	10,3±0,7	8,4±0,5
V H ₂ O	9,2±1,6	4,0±0,7	6,1±0,4	6,0±0,8
VI	275,8±10,5	312,5±9,3	127,4±6,8	130,8±9,0
VII	286,6±11,6	305,8±22,6	126,2±7,1	131,3±10,3
VIII	11,0±1,8	21,9±2,3	66,0±4,7	62,2±3,5
IX	61,8±2,3	57,2±1,0	113,4±7,6	104,0±5,2

A microalga *Nannochloropsis* F&M-M24 apresentou maiores valores de AE o/a quando a extração do biossurfactantes foi realizada com etanol (extrato VI) e com água (extrato II amb e IX). Para *T. suecica* OR os maiores valores de AE o/a foram obtidos quando a extração foi realizada com água (extrato IV H₂O e IX).

Ambas as microalgas *Scenedesmus* sp. 3PAV3 e *Chlorella* sp. PROD1 apresentaram maiores valores de AE o/a quando a extração do biossurfactantes foi realizada com etanol e metanol (extrato VI e VII).

Segundo BATISTA et al. (2006) e KARANATH et al. (1999), além de reduzir tensões superficiais e interfaciais, os biossurfactantes usualmente exibem capacidade emulsificante.

Os valores de AE o/a encontrados para *Scenedesmus* sp. 3PAV3 foram superiores aos encontrados para o emulsificante comercial lecitina de soja (Tabela 3), muito utilizado na indústria de alimentos.

Tabela 3 AE o/a (UE) dos emulsificantes sintéticos utilizados como padrões

Padrão	Massa (mg)	Óleo de soja	Óleo de girassol
Lecitina de soja	5,0	257,0	229,0
Tween 80	5,0	603,0	580,5

A microalga *Scenedesmus* sp. 3PAV3 foi cultivada em condições extremas de luminosidade e temperatura, já que esta foi cultivada no inverno. Estes podem ser alguns dos motivos desta microalga ter apresentado maior atividade emulsificante, já que autores relatam que a maior quantidade de biossurfactantes pode ser produzida por micro-organismos em condições extremas de cultivo (DESAI & BANAT, 1997).

VEENANADIG et al. (2000) produzindo biossurfactantes em biorreatores de colunas a partir de *Bacillus subtilis* alcançaram uma atividade AE o/a máxima de $1,9 \text{ UE.g}^{-1}$ em 31 h de fermentação, valores estes inferiores aos obtidos no presente trabalho.

MARTINS et al. (2008) estudaram a produção de biossurfactantes por fermentação em estado sólido utilizando o fungo *Aspergillus fumigatus* EFB1 e este apresentou AE o/a de $12,33 \text{ UE.g}^{-1}$. O mesmo fungo foi estudado por COSTA (2004) na produção de biossurfactantes, apresentando uma atividade AE o/a de $12,65 \text{ UE.g}^{-1}$.

SHEPHERD et al. (1995) estudaram diferentes micro-organismos para produção extracelular de emulsificantes de alto peso molecular para uso potencial em alimentos. Foram testados 24 produtos extracelulares de bactérias, leveduras e microalgas. Dentre as microalgas testadas estavam *Porphiridium cruentum* e a *Spirulina* spp. cultivadas em fotobiorreatores com meio contendo sais inorgânicos e fonte orgânica de carbono como glicose, sacarose, lactose e óleo vegetal. *P. cruentum* e *Spirulina* spp. apresentaram 0,71 e 0,70 unidades de densidade óptica (OD) de atividade emulsificante e 100 e 47% de estabilidade emulsionante, respectivamente.

Os valores de atividade emulsificante água/óleo (AE a/o) para todos os extratos estudados para as microalgas *Nannochloropsis* sp. FM – M24, *T. suecica* OR, *Scenedesmus* sp. 3PAV3 e *Chlorella* sp. PROD1, apresentaram valores semelhantes, de 45 a 48 UE.g^{-1} . Através destes resultados verifica-se que as microalgas são mais eficientes como emulsionantes de o/a do que em a/o. As emulsões a/o podem ter ocorrido por presença de um estabilizante. Emulsões a/o são estabilizadas pela presença de lipídios polares e proteínas que se encontram na interface água/óleo. Para isso, foram realizadas provas de estabilidade das emulsões formadas dos diferentes extratos (Tabela 4).

Tabela 4 Prova de estabilidade das emulsões formadas da AE a/o para os extratos estudados, medida em número de dias

Extrato	<i>Nannochloropsis</i>		<i>T. suecica</i> OR		<i>Scenedesmus</i>		<i>Chlorella</i> sp.	
	Soja	Girassol	Soja	Girassol	Soja	Girassol	Soja	Girassol
VI	5	5	8	8	21	21	6	1
VII	3	2	8	23	287	70	6	1
VIII	5	8	8	8	3	3	3	6
IX	7	5	5	5	6	6	9	3

A microalga *Scenedesmus* sp. 3PAV3 apresentou maior capacidade como estabilizante de emulsões água/óleo, chegando a mais de 7 meses de estabilidade.

De acordo com BATISTA et al. (2006), o critério utilizado para selecionar micro-organismos produtores de biossurfactantes é a habilidade em reduzir a tensão superficial abaixo de 40 mN.m⁻¹. A capacidade de estabilização da emulsão é a habilidade em manter pelo menos 50% do volume da emulsão original 24 h depois da sua formação.

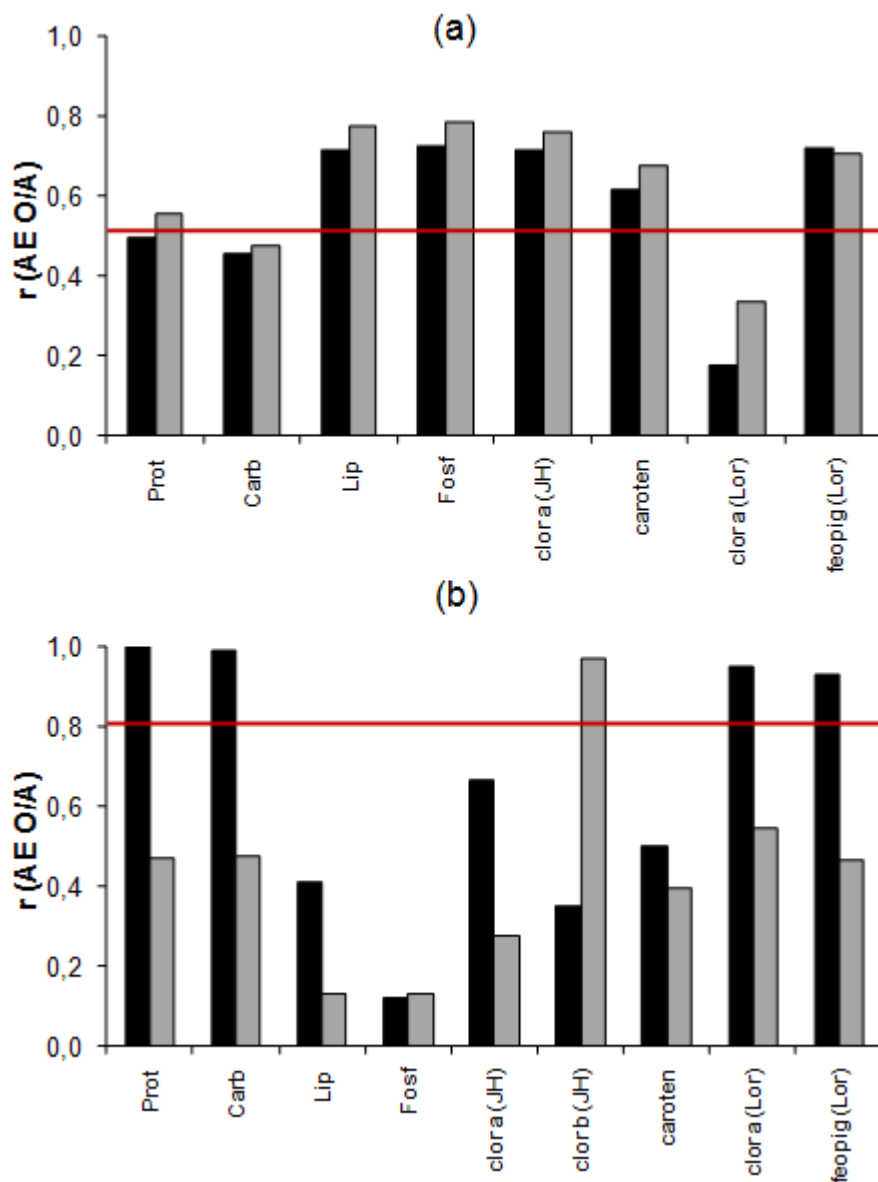
RAYMUNDO et al. (2005) obtiveram resultados significativos (p<0,05) quando estudaram *Chlorella vulgaris* como estabilizante de emulsões óleo/água. Segundo GOUVEIA et al. (2004) a utilização de biomassa de microalgas como um ingrediente de emulsões em alimentos, tem sido recentemente estudada na atuação como agente de coloração. A adição de biomassa de microalgas em emulsão pode produzir diferentes efeitos: melhoria da estabilidade através do desenvolvimento de efeitos com o conteúdo protéico ou perda de viscoelasticidade na superfície quando induzido ao deslocamento da proteína na interface, como qualquer outro aditivo emulsionante (DICKINSON & HONG, 1995).

Os emulsionantes são substâncias caracterizadas pela presença de uma região polar e outra apolar em suas estruturas moleculares. Podem formar emulsões do tipo água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A), as quais são definidas, principalmente pelo equilíbrio apresentado entre a parte polar e a apolar do emulsionante empregado, denominado tecnicamente de Equilíbrio-Hidrófilo-Lipófilo (EHL). O EHL é numericamente representado em escala com valores que vão de zero a vinte, em função do tamanho da cadeia polar presente nas moléculas do emulsionante. Assim, valores inferiores a dez indicam predominância da parte apolar nessas, tornando-as adequadas para o preparo de emulsões A/O. Ao contrário, valores superiores a dez apontam a prevalência da região polar e o emprego dessas substâncias na obtenção de emulsões O/A (CUNHA JÚNIOR et al., 2003). O Tween 80 (surfactante sintético) apresenta EHL de 14,9, o qual é adequado no preparo de emulsões O/A e a lecitina de soja

(emulsificante comercial) apresenta EHL de 8,0 sendo considerada adequada na preparação de emulsões do tipo A/O.

Entretanto, como todos os extratos apresentaram melhores resultados para AE o/a, pode existir algum componente predominantemente mais hidrófilo do que lipófilo em todos os extratos para todas as microalgas estudadas. O cálculo de EHL é relacionado a uma molécula, que neste trabalho não foi feito, mas para dar uma idéia geral do que há nos extratos, pode ser uma explicação.

A Figura 2 apresenta a correlação (r) da AE o/a com os componentes químicos presentes nos extratos estudados das microalgas estudadas.



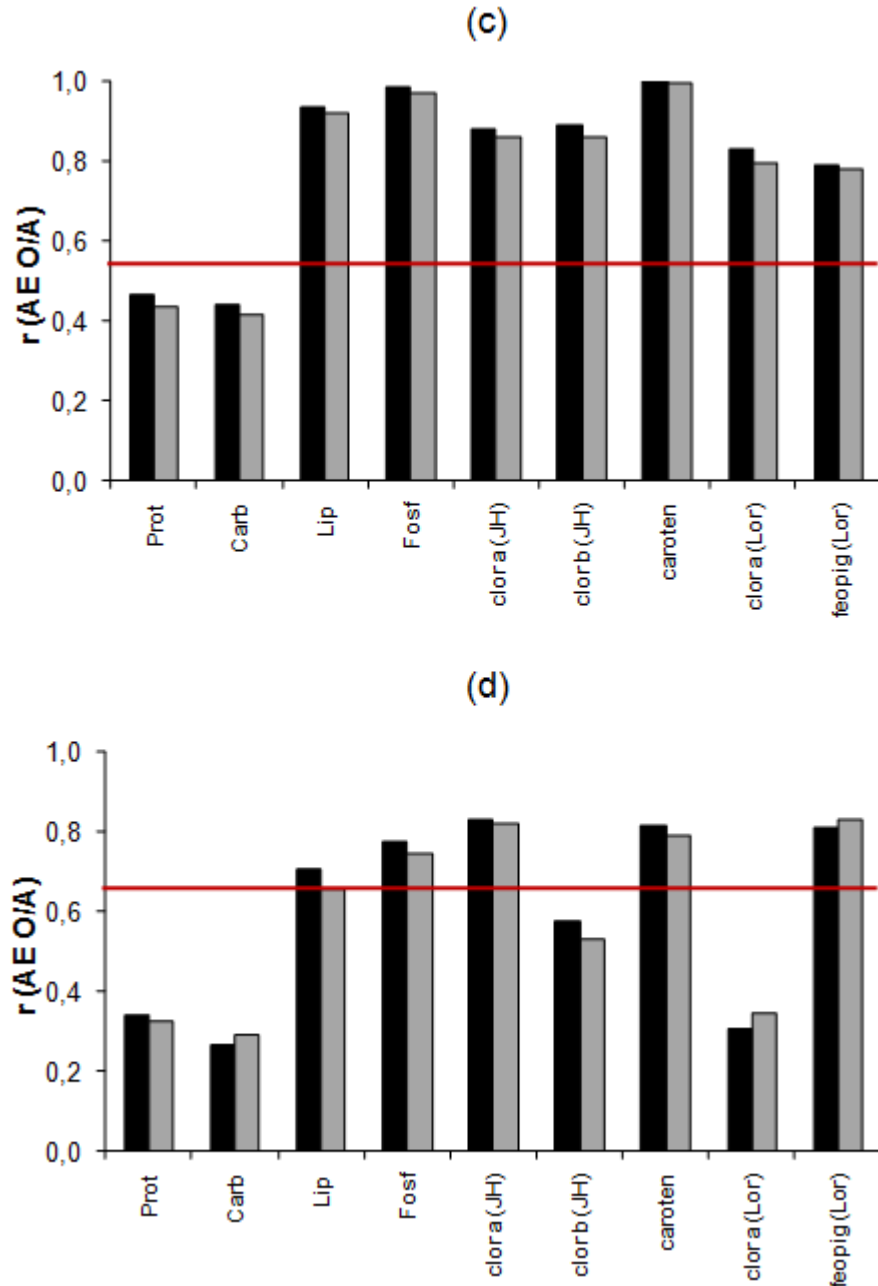


Figura 3 Correlação da AE o/a com os componentes químicos presentes nos extratos estudados para (a) *Nannochloropsis* sp. FM – M24; (b) *T. suecica* OR; (c) *Scenedesmus* sp. 3PAV3 e (d) *Chlorella* sp. PROD1: (■) óleo de soja; (□) óleo de girassol. A linha vermelha representa a correlação significativa ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

A microalga *Nannochloropsis* F&M-M24 apresentou correlação positiva ($p < 0,05$) de AE o/a com teor de lipídios, fosfolipídios, clorofila a (calculada segundo JEFFREY e

HUMPHREY, 1965), carotenóides e feopigmentos, para análise feita com óleo de soja. Quando realizada com óleo de girassol a correlação foi semelhante, mas também apresentou correlação positiva ($p < 0,05$) com o teor de proteínas. Já a microalga *T. suecica* OR apresentou comportamento diferente quando comparadas as análises feitas com óleo de soja ou girassol. Quando realizada com óleo de soja a correlação foi positiva quanto ao teor de proteínas, carboidratos, clorofila a (calculada segundo LORENZEN, 1967) e feopigmentos, e somente para o teor de clorofila b (calculada por JH) a correlação foi positiva ($p < 0,05$) em relação à AE o/a realizada com óleo de girassol.

Scenedesmus sp. 3PAV3 e *Chlorella* sp. PROD1 apresentaram mesmo comportamento quando comparadas as análises feitas com óleo de soja ou girassol, onde *Scenedesmus* sp. 3PAV3 apresentou correlação positiva ($p < 0,05$) de AE o/a com teor de lipídios, fosfolipídios, clorofila a (calculada por JH), clorofila b (calculada por JH), carotenóides, clorofila a (calculada segundo LORENZEN, 1967) e feopigmentos, e *Chlorella* sp. PROD1 apresentou correlação positiva ($p < 0,05$) de AE o/a com teor de lipídios, fosfolipídios, clorofila a (calculada por JH), carotenóides e feopigmentos

Segundo BANAT et al. (2010), os biossurfactantes são classificados de acordo com a composição química da molécula e com o micro-organismo produtor, compreendendo uma ampla variedade de estruturas químicas como glicolipídios, lipopeptídios, lipoproteínas, lipídios neutros, ácidos graxos e fosfolipídios.

A Tabela 5 apresenta os menores valores de tensão superficial para os extratos VI (extração com etanol), VII (extração com metanol), VIII (extração com clorofórmio) e IX (extração com água) para as microalgas estudadas. Os extratos foram realizados com a biomassa microalgal final.

Tabela 5 Tensões superficiais (TS, mN.m⁻¹) para as microalgas estudadas

Microalga	Extrato	TS
	VI	30,0±0,84
<i>Nannochloropsis</i>	VII	ND
F&M-M24	VIII	ND
	IX	ND
	VI	32,8±0,89
<i>Tetraselmis</i>	VII	29,1±0,29
<i>suecica</i> OR	VIII	27,4±0,21
	IX	47,9±1,00
	VI	31,2±0,21
<i>Scenedesmus</i>	VII	31,9±0,59
sp. 3PAV3	VIII	43,9±0,19
	IX	43,7±1,12
	VI	29,5±0,64
<i>Chlorella</i> sp.	VII	29,1±0,33
PROD1	VIII	28,9±0,30
	IX	37,6±0,70

ND: não determinado

Os menores valores de tensões superficiais variaram de 27,4 a 31,2 mN.m⁻¹, para as microalgas estudadas. Estes resultados mostram a potencialidade das microalgas estudadas na produção de biossurfactantes, tanto pela redução da tensão superficial e interfacial, como pelo aumento da atividade emulsificante. Segundo MULLIGAN (2005) um bom surfactante pode diminuir a tensão superficial da água de 72,0 para 35,0 mN.m⁻¹ e a tensão interfacial (tensão entre líquidos não polares e polares) da água contra n-hexadecano de 40,0 para 1,0 mN.m⁻¹.

CROSMAN et al. (2002) estudaram o aumento da produção de biossurfactantes por *Corynebacterium alkanolyticum* ATCC 21511 utilizando hexadecano como substrato. O biossurfactantes do tipo fosfolípido produzido foi capaz de reduzir a tensão superficial para valores abaixo de 32 mN.m⁻¹.

A produção de biossurfactantes do tipo lipopeptídio por uma cepa de *Bacillus subtilis* termo resistente foi estudada por MAKKAR & CAMEOTRA (2001). A fonte de carbono utilizada foi a sacarose, na concentração de 2 g.L⁻¹. As condições de cultivo foram temperatura de 45°C,

agitação de 200 rpm e aeração de 1 vvm. A concentração de biossurfactantes obtida foi $4,5 \text{ g.L}^{-1}$, e a menor tensão superficial 27 mNm^{-1} .

Bacillus subtilis ATCC 21332 produziram surfactina, biossurfactantes lipopeptídico, utilizando batata como substrato. Os cultivos foram conduzidos em frascos agitados a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 72 h. A produção do biossurfactantes resultou na redução da tensão superficial de 71,3 para $28,3 \text{ m.N.m}^{-1}$ (água residuária contendo batata) e para $27,5 \text{ mN.m}^{-1}$ (meio contendo sais minerais) (FOX e BALA, 2000).

A surfactina (lipopeptídeo cíclico) é um dos mais efetivos biossurfactantes, pois pode reduzir a tensão superficial da água de 72 m.N.m^{-1} para 27 m.N.m^{-1} e possui várias atividades biológicas, tais como função antibacteriana ou atividade antiviral, atividade citoplasmática, inibição da formação de coágulo fibroso e estímulo da atividade macrofagócita (MORIKAWA et al., 2000).

4.2.6 CONCLUSÕES

Os maiores valores de AE óleo/água foram obtidos para os extratos utilizando metanol e etanol como solvente. A microalga *Scenedesmus* apresentou valor de AE óleo/água superior ($312,5 \text{ UE.g}^{-1}$).

Os mínimos valores de tensões superficiais variam de $27,4$ a $31,2 \text{ mN.m}^{-1}$ para as microalgas estudadas.

Os resultados mostraram a potencialidade de produção de biossurfactante pela microalga *Scenedesmus* sp. 3PAV3, tanto pela redução da tensão superficial e elevados valores de atividade emulsificante, quanto sua capacidade de atuação como estabilizante de emulsões.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e à equipe do Prof. Dr. Mario R. Tredici da Università degli Studi di Firenze (Itália) pela acolhida no desenvolvimento do trabalho.

4.2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; JÚNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova*, 30, 409-414, 2007.

BARTH, G.; GAILLARD, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*, 19, 219-237, 1997.

BATISTA, S. B; MOUNTEER, A. H.; AMORIM, F. R.; TOTOLA, M. R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier from petroleum-contaminated sites. *Bioresour Technol*, 97, 868–875, 2006.

BIGOGNO, C.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; COHEN, Z. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry*, 60, 497–503, 2002.

BLIGH, E. G.; DYER, W.T. A method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 77, 911–917, 1959.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces*. 152, 41-52, 1999.

BOROWITZKA, M. A. Algal growth media and sources of culture. In: BOROWITZKA, M. A. e BOROWITZKA, L. J., eds, *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, 456-465, 1988.

BRODERICK, L. S.; COONEY, J. J. Emulsification of hydrocarbons by bacteria from freshwater ecosystems. Contribution n° 1149, Center for Environmental and Estuarine Studies of the University of Maryland. 8, s/d.

CEVC, G. *Phospholipids – Handbook*. Marcel Dekker, Inc. New York, EUA. 1993.

CHAUTON, M. S.; STORSETH, T. R.; KRANE, J. Analysis of whole cells of *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae), and comparison with analysis of lipophilic extracts. *Journal of Phycology*, 40, 611-618, 2004.

COSTA, E. Produção e avaliação das propriedades de biossurfactantes produzido em fermentação fúngica em estado sólido. Dissertação de mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande/RS, 2004.

- CROSMAN, J. T.; PINCHUK, R. J.; COOPER, D. G. Enhanced biosurfactant production by *Corynebacterium alkanolyticum* ATCC 21511 using self-cycling fermentation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 79, 5, 467-472, 2002.
- CUNHA JÚNIOR, A. S.; FIALHO, S. L.; CARNEIRO, L. B.; ORÉFICE, F. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. *Arq Bras Oftalmol*, 66, 385-91, 2003.
- DESAI, J. D.; BANAT I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Rev*, 61, 47-64, 1997.
- DICKINSON, E.; HONG, S. T. Influence of water soluble nonionic emulsifier on the rheology of heat-set protein stabilized emulsions gels. *Food Hydrocolloids*, 43, 25-60, 1995.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.*, 28 (3), 350-356, 1956.
- DYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Applications of Microbial Surfactants. *Biotechnology Advances*. 9, 241-252. 1991.
- FOX, S. L.; BALA, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. *Bioresource Technology*. 75, 235-240, 2000.
- GOUVEIA, L.; RAYMUNDO, A.; BATISTA, A. P.; MIRANDA, A.; SOUSA, I.; EMPIS, J. Colouring emulsions using microbial biomass – stability over time. In L. Dufosse' (Ed.), *Pigments in food – more than colours* (pp. 121-123). Quimper: Pigments Publishing, Université de Bretagne Occidentale, 2004.
- GUILLARD, R. R. L.; RYTHER, J. H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* (Hustedt) and *Detonula confervacea* (Cleve). *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239, 1962.
- JEFFREY, S. W.; HUMPHREY, G. F. New spectrophotometric equation for determining chlorophyll a, b, c1 and c2. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 167, 194-204, 1975.
- JOHNSON, V.; SIGH, M.; SAINI, V. S. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *Biotechnology letters*, 1992.
- KAPPELI, O.; FINNERTY, W. R. Partition of Alkane by an Extracellular Vesicle Derived from Hexadecane-Grown *Acinetobacter*. *Journal of Bacteriology*, 140, 2, 707-712, 1979.
- KARANTH, N. G. K., DEO, P. G., VEENANADIG, N. K. Microbial production of biosurfactant and their importance. *Ferment. Sci. Technol.* 77, 116-126, 1999.
- KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. *Pure & Appl. Chem.*, 64, 11, 1731-1737, 1992.

- LANG, S.; F. WAGNER. Bioconversion of oils and sugars to glycolipids, p. 205–227. In N. Kosaric (ed.), *Biosurfactants: production, properties, applications*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. 1993.
- RODOLFI, L.; CHINI ZITTELLI, G.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 1, 100-112, 2009.
- LIMA, A. S.; SAMPAIO, R. M.; ALEGRE, R. M. Bioemulsifier production: Study of the operational conditions and stabilization properties. *Tecnologia Química*, 17, 2, 18-22, 1997.
- LORENZEN, C. J. Determination of Chlorophyll and Pheo-Pigments: Spectrophotometric Equations. *Limnology and Oceanography*, 12, 2, 343-346, 1967.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1975.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Synthesis of enhanced biosurfactant by *Bacillus subtilis* MTCC 2423 at 45°C by foam fractionation. *Journal of surfactants and Detergents*. 4, 4, 355-357, 2001.
- MARSH, J. B.; WEINSTEIN, D. B. Simple charring method for determination of lipids. *J. of Lipid Research*, 7, 574-576, 1966.
- MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactantes em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. *Quim. Nova*, 31, 8, 1942-1947, 2008.
- MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1488, 211-218, 2000.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using cassava processing effluent. *Appl Biochem Biotechnol* 112, 163–172, 2004.
- PARSONS, T. R.; STRICKLAND, J. D. H. Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophyll-a and carotenoids. *Journal Marine Research*, 21, 105-156, 1963.

- RAYMUNDO, A.; GOUVEIA, L.; BATISTA, A. P.; EMPIS, J.; SOUSA, I. Fat mimetic capacity of *Chlorella vulgaris* biomass in oil-in-water food emulsions stabilized by pea protein. *Food Research International*, 38, 961–965, 2005.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111, 1–61, 1979.
- RODRIGUES, L.; MOLDES, A.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus strains*. *Biochemical Engineering Journal*. 28, 109-116, 2006.
- SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SHUTHERLAND, I. W.; ROLLER, S. Novel bioemulsifer from microorganisms for use in foods. *J Biotechnol* 40: 207-217, 1995.
- SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnol. Adv.*, 2007, 25, 99–122.
- STEWART, J. M.C. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal. Biochem.*, 104, 10, 1980.
- SZUHAI, B. F. Lecithins sources, manufacture & uses. *American Oil Chemists' Society.*, 74-76, 1989.
- TREDICI M. R.; RODOLFI, L. Reactor for industrial culture of photosynthetic micro-organisms. Patent WO 2004/074423 A2 to Università degli Studi di Firenze, 2004.
- VEENANADIG, N. K.; GOLTHAMAN, M. K.; KARANTH, N. G. K. Scale up Studies for the production of biosurfactant in packed column bioreactor. *Bioprocess Engineering*. 22, 95-99, 2000.
- XUE, C.; HU, Y.; SAITO, H.; ZHANG, Z.; LI, Z.; CAI, Y.; OU, C.; LIN, H.; IMBS, A. B. Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*, 77, 9–13, 2002.

4.3 PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR MICROALGAS EM DIFERENTES FOTOBIOREACTORES

Elisângela M. Radmann¹, Natascia Biondi², Mario R. Tredici², Jorge A. V. Costa^{1*}

¹ Laboratório de Engenharia Bioquímica, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Caixa Postal 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil. Fax: +55-53-3233 8745. *E-mail: jorge@pq.cnpq.br

² Departamento de Biotecnologia Agrária, Università degli Studi di Firenze, P.le delle Cascine 24, 50144 Firenze, Itália.

4.3.1 RESUMO

As microalgas *Chlorella* sp. PROD1 e *Scenedesmus* sp. 3PAV3 foram cultivadas em diferentes condições nutricionais e em diferentes fotobiorreatores, visando estimular a produção de biossurfactantes. Os fotobiorreatores utilizados neste estudo foram do tipo *Green Wall Panel* (GWP), *Annular Column* (AC) e *Raceway*. Os maiores valores de atividade emulsificante óleo/água (AE o/a) foram obtidos para os extratos utilizando metanol e etanol como solvente. A microalga *Chlorella* sp. PROD1 apresentou valor de AE o/a semelhante (258,2 UE.g⁻¹) ao encontrado para o emulsificante comercial lecitina de soja (257 UE.g⁻¹) e ambas as microalgas alcançaram valores de tensões superficiais abaixo de 30 mN.m⁻¹. Os resultados demonstraram a potencialidade das microalgas estudadas na produção de biossurfactantes, tanto pela redução da tensão superficial e interfacial, como pelo aumento da atividade emulsificante.

Palavras-chave: *Annular Column*, biossurfactantes, *Chlorella*, *Green Wall Panel*, *Raceway*, *Scenedesmus*.

4.3.2 ABSTRACT

The microalgae *Chlorella* sp. PROD1 and *Scenedesmus* sp. 3PAV3 were grown in different nutritional conditions and in different photobioreactors, to stimulate the biosurfactant production. The photobioreactors used In this study were the *Green Wall Panel* (GWP), *Annular Column* (AC) and *Raceway*. The higher values of emulsifying activity oil/water (EA o/w) were obtained for the extracts using methanol and ethanol as solvent. The microalgae *Chlorella* sp. PROD1 showed the value of EA o/w similar (258.2 UE g⁻¹) to that found for the commercial emulsifier soy lecithin (257 UE g⁻¹) and both microalgae reached values of surface tensions below 30 mN m⁻¹. The results demonstrated the potential of microalgae Studied in the biosurfactant production, not only by reducing surface and interfacial tension, but also for increased emulsifying activity.

Keywords: *Annular Column*, biosurfactants, *Chlorella*, *Green Wall Panel*, *Raceway*, *Scenedesmus*.

4.3.3 INTRODUÇÃO

A biotecnologia de microalgas, segundo o estado da arte, tem sido enfocada em novas técnicas de cultivo e sua utilização na alimentação humana e animal, cosméticos e fármacos, e para aplicações ambientais, carecendo estudos relacionados à produção de biossurfactantes.

O foco deste trabalho foi a produção de biossurfactantes por microalgas, já que há relatos na literatura que as microalgas são grandes produtoras de compostos como glicolípidios, fosfolípidios e lípidios neutros (RODOLFI et al. 2009; CHAUTON et al., 2004; XUE et al., 2002; BIGOGNO et al., 2002; CEVC, 1993; KOSARIC, 1992; SZUHAJ, 1989; BOROWTZKA, 1988), que, por sua vez, podem ser biossurfactantes (DESAI e BANAT, 1997). Biossurfactantes são compostos anfífilos contendo uma parte hidrofílica e uma porção hidrofóbica e, portanto, são capazes de exibir uma variedade de atividades de superfície que permitem a solubilização de substratos hidrofóbicos (DESAI e BANAT, 1997).

Os biossurfactantes, durante a última década têm sido objeto de investigação, por serem possíveis substitutos para os surfactantes sintéticos e apresentar potencial de aplicação industrial e ambiental relacionado com as propriedades de emulsificação, formação de espuma, detergência, dispersão e solubilização de compostos hidrofóbicos (DASTGHEIB et al., 2008).

A estimulação na microalga à produção de biossurfactantes pode ser alcançada com uso de diferentes fontes de carbono, nitrogênio e também através da limitação destes no meio de cultivo. A produção de biossurfactantes também pode ser influenciada pelas condições de cultivo como pH, temperatura e agitação (BANAT, 1995). Associado a estes fatores, o tipo de reator e sua operação podem influenciar a produção deste composto e qualidade do produto final.

A produção industrial de microalgas é realizada predominantemente em biorreatores abertos do tipo *Raceway*. Estes biorreatores podem apresentar zonas de estagnação da cultura, onde as células não recebem luz, afetando o processo fotossintético e baixando a absorção de CO₂, bem como o crescimento celular. Os fotobiorreatores fechados (FBRs) têm evoluído bastante e novos modelos têm sido propostos. Os FBRs são considerados sistemas flexíveis, podendo ser otimizados em função das características da espécie cultivada e permitirem o cultivo de microalgas que não podem ser cultivadas em tanques abertos devido a contaminação.

Observando estes aspectos, o objetivo deste trabalho foi estudar as microalgas *Chlorella* sp. PROD1 e *Scenedesmus* sp. 3PAV3 em diferentes biorreatores e condições de cultivo para a produção de biossurfactantes.

4.3.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.4.1 Micro-organismos e condições de cultivo

Scenedesmus sp. 3PAV3 e *Chlorella* sp. PROD1 da coleção de cultura do Departamento de Biotecnologia Agrária da Università degli Studi di Firenze (Itália) foram cultivadas em diferentes fotobiorreatores. *Scenedesmus* sp. 3PAV3 foi cultivada em *Green Wall Panel* (GWP – Figura 1b) (TREDICI e RODOLFI, 2004) e em *Raceway* (Figura 1c). *Chlorella* sp. PROD1 foi cultivada em *Annular Column* de 6 L (AC 6 – Figura 1a), um cultivo controle com meio padrão de cultivo e outro com limitação de nitrogênio (-N), e em GWP (Figura 1b).

As microalgas foram cultivadas em meio BG-11 (RIPPKA et al., 1979), preparada com água destilada e com adição de soluções nutrientes estéreis. NaNO_3 e K_2HPO_4 foram adicionados aos cultivos de acordo com o crescimento microalgal, considerando-se que N e P representam 10% e 1% da biomassa, respectivamente (RODOLFI et al., 2009). Para a cultura com limitação de nitrogênio (*Chlorella* sp. PROD1 em AC 6), o procedimento foi o mesmo, partindo com BG-11 padrão (com NaNO_3), mas sem adição de NaNO_3 ao longo do tempo de cultivo.

CO_2 foi injetado aos cultivos durante o dia para fornecer carbono às culturas e regular o pH $8,0 \pm 0,2$. Para os cultivos com *Chlorella* sp. PROD1 em AC 6 (controle e -N) e GWP, foi adotado o sistema de cultivo descontínuo e para os cultivos de *Scenedesmus* sp. 3PAV3 foi adotado o sistema semicontínuo, onde diariamente, no início do dia, uma fração pré-determinada (30%) de cultura foi retirada e substituída pelo mesmo volume com meio de cultivo novo.

A variação diurna de temperatura e a luminosidade nas culturas foi medida durante um dia das 8 às 18 h. A luminosidade foi medida através de luxímetro digital, da luz direta e difusa em vários pontos dos fotobiorreatores, expressa em densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD, $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Também foi medida a radiação solar na horizontal para comparação.

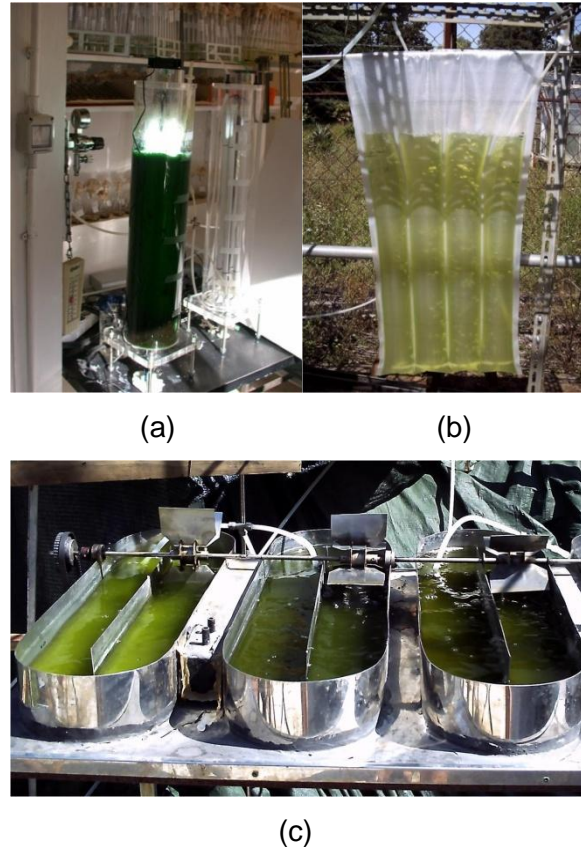


Figura 1 Fotobiorreatores para produção de microalgas (a) *Annular Column* de 6 L (AC 6); (b) *Green Wall Panel* (GWP); (c) *Raceway*

4.3.4.2 Determinações analíticas

O crescimento das culturas foi estimado através da medida da concentração de biomassa em peso seco (CHINI ZITTELLI et al., 2000). A produtividade da biomassa (P , $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) foi obtida segundo a equação $P = (X_t - X_0)/(t - t_0)$, onde X_t é a concentração de biomassa (g.L^{-1}) no tempo t (d), e X_0 a concentração de biomassa (g.L^{-1}) no tempo t_0 (d) que representa o início de cada ciclo (SCHMIDELL et al., 2001).

4.3.4.3 Estudo da extração do biossurfactantes das microalgas

Foram estudados diferentes tipos de solventes nas extrações dos biossurfactantes das microalgas *Chlorella* sp. PROD1 e *Scenedesmus* sp. 3PAV3, utilizando a mesma proporção de 0,1:7,5 (biomassa seca:água) nas extrações estudadas. Os extratos obtidos foram utilizados para as análises de atividade emulsificante, tensão superficial e tensão interfacial.

4.3.4.3.1 Extração com etanol, metanol ou clorofórmio

A extração foi realizada com etanol, metanol ou clorofórmio e quartzo em agitador de tubos (5 min) e banho ultrassônico (20 min), para rompimento da parede celular, seguido de agitação em agitador magnético durante 5 h, centrifugação e evaporação com resuspensão em água, obtendo-se 3 tipos de extratos.

4.3.4.3.2 Extração com água

A extração foi realizada com água em sonda ultrassônica (20 min), para rompimento da parede celular, seguido de agitação em agitador magnético durante 5 h, centrifugação e evaporação até o volume adequado.

4.3.4.4 Caracterização dos extratos

Todos os extratos obtidos foram caracterizados quanto à composição química, a fim de estimar qual bio surfactantes poderia estar presente nos extratos. Foram realizadas as análises de clorofila (LORENZEN, 1967; JEFFREY e HUMPHREY, 1965), feopigmentos, carotenóides (PARSONS e STRICKLAND, 1963), proteína (LOWRY et al., 1951), carboidratos (DUBOIS et al., 1956), lipídios (MARSH e WEINSTEIN, 1966) e fosfolipídios (STEWART, 1980).

4.3.4.5 Estimativa da atividade bio surfactantes

A estimativa da atividade bio surfactantes foi realizada através da medida das tensões superficial e através das atividades emulsificantes óleo em água e água em óleo.

4.3.4.5.1 Tensão superficial

A análise de tensão superficial foi realizada em tensiômetro (Krüss Processor Tensiometer K-6, Alemanha) usando o método do anel, sendo a tensão medida com a amostra em contato com o ar (RODRIGUES et al., 2006a). Neste método, um recipiente contendo a amostra a ser analisada é suspenso até que o contato com a superfície do anel seja registrado. O contato da amostra com o anel é desfeito, de maneira que o filme líquido produzido abaixo do anel é alongado, sendo determinada a força máxima necessária para a extensão do filme,

obtendo-se a tensão superficial (RODRIGUES et al., 2006a). A tensão superficial foi medida com a amostra em contato com o ar.

4.3.4.5.2 Atividades emulsificantes óleo/água e água/óleo

Foi realizada uma análise de atividade emulsificante óleo/água com diferentes óleos, verificando àquele que melhor se ajustava ao método. Foram testados os óleos de soja, girassol, amendoim, milho e óleo lubrificante. Os óleos que melhor se ajustaram ao método foram os óleos de soja (96%) e de girassol (97%), apresentando transmitância próxima de 100%. As análises de atividade emulsificante foram realizadas em sextuplicata.

As atividades emulsificantes óleo/água e água/óleo foram determinadas utilizando-se a proporção de 2,1:1,4 (água:extrato) e 2 mL de óleo de soja ou girassol. A mistura foi agitada em agitador vortex a 700 rpm por 1 min.

Após 60 min de repouso foi medida a transmitância do meio emulsificado óleo/água em espectrofotômetro (Varian, Mulgrave/Austrália) a 610 nm (JOHNSON et al., 1992), passando-se este valor para absorbância, e diminuindo-se da absorbância do branco (3,5 ml de água destilada e 2 ml de óleo de soja ou girassol), obtida a partir da leitura da amostra diluída. A atividade emulsificante óleo em água foi obtida através da Equação 1.

$$AE_{(O/A)} = (Abs.D) / ((m.(1-U))) \quad (1)$$

Após 24 h de repouso foi realizada leitura da altura da emulsão água/óleo formada e da altura total (altura da emulsão mais altura da camada remanescente de óleo) (BRODERICK & COONEY, 1982), obtendo-se a atividade emulsificante água em óleo de acordo com a Equação 2. O branco foi preparado misturando-se 3,5: 2 (água: óleo) mL, procedendo da mesma forma que para a amostra.

$$AE_{(A/O)} = (E.D) / ((m.(1-U))) \quad (2)$$

Onde:

$AE_{O/A}$ = atividade emulsificante óleo/água ($UE.g^{-1}$);

$AE_{A/O}$ = atividade emulsificante água/óleo ($UE.g^{-1}$);

Abs = absorbância da emulsão óleo/água;

D = diluição da amostra em água;

m = massa da amostra úmida (g);

U = umidade do meio;

E = relação centesimal entre a altura da emulsão e a altura total.



Figura 2 Representação esquemática do ensaio da atividade emulsificante

Fonte: MARTINS (2005)

A atividade emulsificante óleo em água foi definida como a quantidade de biossurfactantes necessário para aumentar a absorvância em 1,0 a 610 nm. A atividade emulsificante água em óleo como a quantidade de biossurfactantes necessário para manter a emulsão estável por 24 h (MARTINS et al. 2008).

4.3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Chlorella sp. PROD1 com meio normal completo (controle) e com limitação de fonte nitrogênio (-N) cultivadas em AC 6, apresentaram comportamento semelhante até 5 d de cultivo (Figura 3) e após, a cultura com limitação de nitrogênio (-N) começou a diminuir a sua produtividade, entrando na fase estacionária de crescimento e apresentando alteração na coloração da cultura. A maioria dos biossurfactantes é liberada no meio de cultura na fase exponencial ou na fase estacionária do crescimento microbiano (MAKKAR e CAMEOTRA, 2001).

Na cultura em GWP de *Chlorella* sp. PROD1, o crescimento apresentou-se mais lento, com produtividade média de $0,10 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. A maior produtividade média ($0,28 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) foi obtida pela microalga quando cultivada em AC 6 controle.

Scenedesmus sp. 3PAV3 quando cultivada em GWP (Figura 4a) apresentou produtividade média de $0,28 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ Em *Raceway* (Figura 4b) a microalga apresentou crescimento mais lento com maior produtividade média ($0,11 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$).

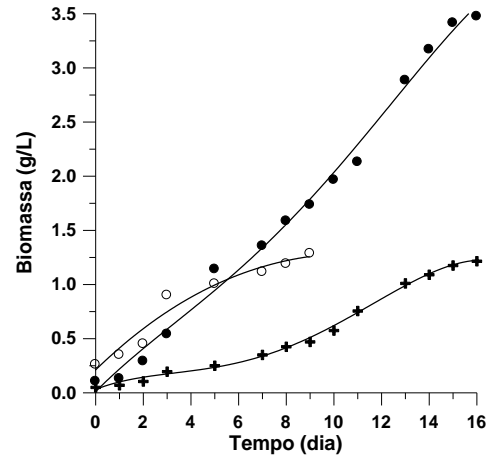


Figura 3 Curvas de crescimento para as culturas de *Chlorella* sp. PROD1 em diferentes fotobiorreatores e modo descontínuo: (●) AC 6 controle; (○) AC 6 -N; (+) GWP

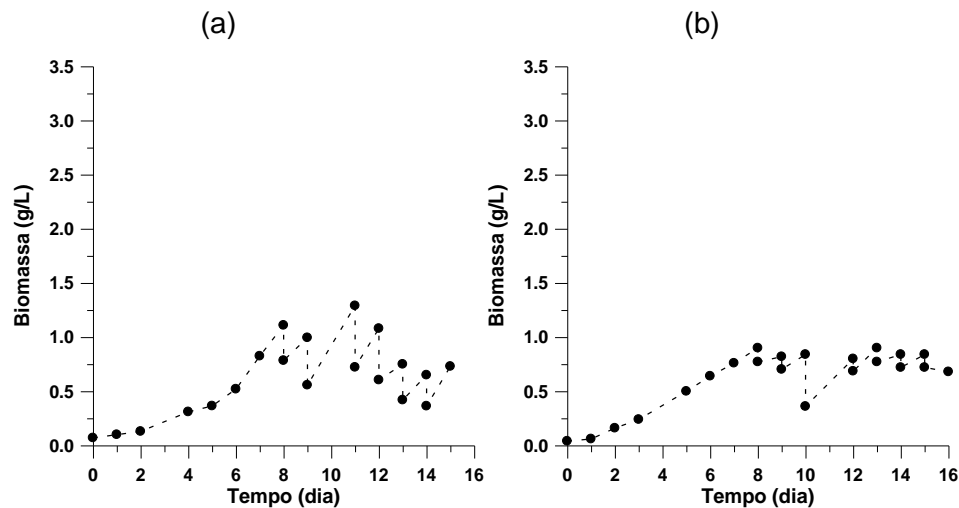


Figura 4 Curvas de crescimento para as culturas de *Scenedesmus* sp. 3PAV3 em diferentes fotobiorreatores em modo semicontínuo: (a) GWP e (b) *Raceway*

Os fotobiorreatores do tipo *Annular columns* utilizados neste trabalho foram desenvolvidos no Departamento de Biotecnologia Agrária da Università degli Studi di Firenze (UniFI) (Itália) e já foram utilizados para produção e eficiência fotossintética de *Tetraselmis suecica* (CHINI ZITTELLI et al., 2006), apresentando produtividade de $0,49 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ em um fotobiorreator AC de 120 L. Também foram utilizados na produção de *Nannochloropsis* (CHINI ZITTELLI et al., 2003; RODOLFI et al., 2003) e *Isochrysis* sp. T-ISO (CHINI ZITTELLI et al., 2004), com iluminância natural, artificial e combinada.

Os fotobiorreatores do tipo *Green Wall Panel*, também desenvolvidos pela mesma equipe na UniFI, já foram utilizados em trabalhos de produção de lipídios pela microalga marinha *Nannochloropsis* sp. F&M-M24. Um dos trabalhos proposto por RODOLFI et al. (2009), em que foi realizado um cultivo controle e outro cultivo com limitação de nitrogênio, alcançando 0,36 e 0,30 g.L⁻¹.d⁻¹ de produtividade, respectivamente.

A produção comercial de microalgas é realizado predominantemente em biorreatores abertos do tipo Raceway.

Apesar de poucos trabalhos serem realizados quanto à comparação dos fotobiorreatores utilizados em cultivo *outdoor*, uma percepção geral é de que em fotobiorreatores fechados a produtividade é mais elevada do que em *Raceways* (TREDICI e MATERASSI, 1992).

Quanto à análise de atividade emulsificante óleo/água (AE o/a), para os extratos de *Chlorella* sp. PROD1 e *Scenedesmus* sp. 3PAV3 cultivadas em diferentes condições, os maiores resultados foram encontrados para *Chlorella* sp. PROD1 quando cultivada em GWP (Tabelas 1 e 2) e a extração do biossurfactantes realizada com água. AE o/a alcançada pela microalga *Chlorella* sp. PROD1 (258,2 UE) foi é semelhante à encontrada para lecitina de soja (257,0 UE), usada comercialmente tanto como emulsionante quanto como lubrificante em diversas atividades econômicas, como na indústria farmacêutica ou alimentar. Por exemplo, é utilizada como emulsionante em chocolates e na produção de revestimento para alimentos.

Tabela 1 Resultados de AE óleo/água (UE.g⁻¹) para as culturas de *Chlorella* cultivada em AC controle (Chlo AC), *Chlorella* cultivada em AC com limitação de N (Chlo AC -N), *Chlorella* cultivada em GWP (Chlo GWP), *Scenedesmus* cultivada em GWP (Sc GWP) e *Scenedesmus* cultivada em *Raceway* (SC R) para análise realizada com óleo de soja

Culturas	Etanol	Metanol	Clorofórmio	Água
<i>Chl</i> AC	127,4±6,8	126,2±7,1	66,0±4,7	113,4±7,6
<i>Chl</i> AC -N	98,2±2,3	138,1±8,9	78,7±6,3	110,6±3,9
<i>Chl</i> GWP	57,5±6,2	73,3±9,1	63,2±4,7	258,2±21,5
Sc GWP	122±11,9	85,8±6,2	7,7±0,7	73,0±8,9
Sc R	111,5±7,9	112,0±6,6	9,9±1,3	71,7±9,6

Tabela 2 Resultados de AE óleo/água (UE.g^{-1}) para as culturas de *Chlorella* cultivada em AC controle (Chlo AC), *Chlorella* cultivada em AC com limitação de N (Chlo AC -N), *Chlorella* cultivada em GWP (Chlo GWP), *Scenedesmus* cultivada em GWP (Sc GWP) e *Scenedesmus* cultivada em Raceway (SC R) para análise realizada com óleo de girassol

Culturas	Etanol	Metanol	Clorofórmio	Água
Chl AC	130,8±9,0	131,3±10,3	62,2±3,5	104,0±5,2
Chl AC -N	100,0±5,1	138,2±6,0	75,4±4,8	110,0±5,8
Chl GWP	59,3±4,1	59,2±4,7	53,0±6,1	214,1±24,0
Sc GWP	97,2±8,7	85,0±7,6	7,7±0,9	72,2±10,2
Sc R	102,1±6,5	107,4±8,2	8,4±0,6	62,5±2,2

A Figura 5b apresenta a variação de PPFD, medida da luz direta e difusa em vários pontos no biorreator GWP com *Chlorella* sp. PROD1 durante o dia (das 8 às 18h). Também foi medida a radiação solar na horizontal para comparação. A partir dos dados de luminosidade apresentados para a radiação solar na horizontal, no intervalo das 10 às 14 h do dia foram alcançados maiores valores de PPFD. Já para a luz direta e direta + difusa, o maior pico de PPFD foi obtido somente às 10 h do dia, diminuindo subitamente, e para luz difusa os valores foram próximos a zero, demonstrando que a microalga foi cultivada em condições extremas de luminosidade. A Figura 5a apresenta a variação de temperatura (18 a 36 °C) da cultura de *Chlorella* sp. PROD1 em GWP durante o dia. Estes podem ser alguns dos motivos desta microalga ter apresentado maior atividade emulsificante, pois segundo DESAI e BANAT (1997), maior quantidade de biossurfactantes pode ser produzida por micro-organismos em condições extremas de cultivo.

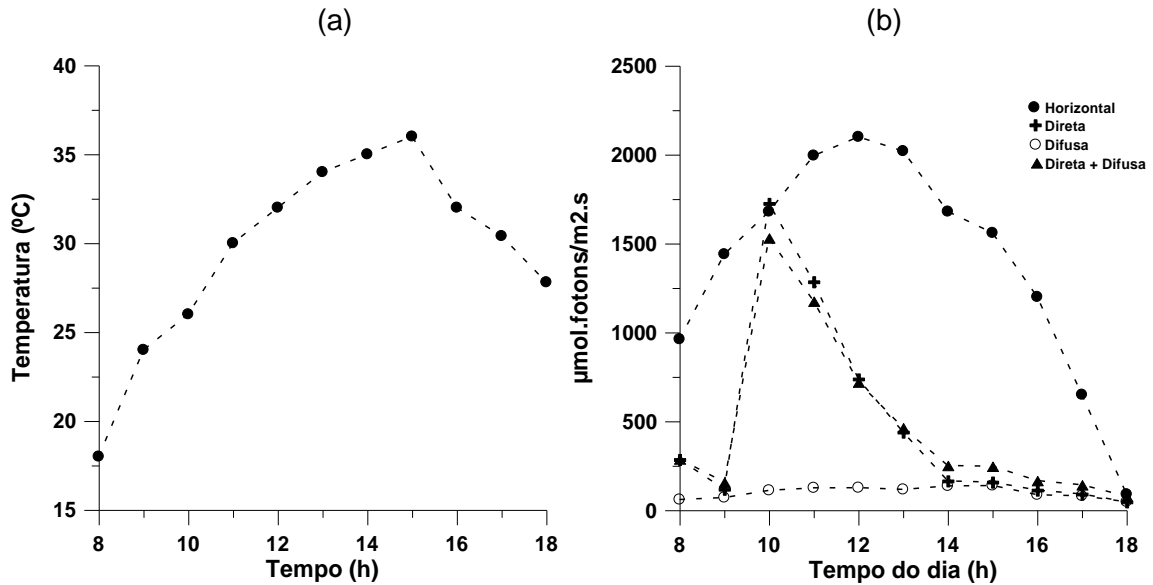


Figura 5 Variação diurna de temperatura (a) e densidade de fluxo de fótons fotossintéticos - PPF (b) para *Chlorella* sp. PROD1 em GWP

Os valores de atividade emulsificante água/óleo (AE a/o) para todos os extratos estudados para as microalgas *Scenedesmus* sp. 3PAV3 e *Chlorella* sp. PROD1, apresentaram valores semelhantes, de 45 a 48 UE.g^{-1} . As emulsões água/óleo são estabilizadas pela presença de lipídios polares e proteínas que se encontram na interface água/óleo. Este pode ser um dos motivos da obtenção de baixos valores de AE a/o para todos os extratos estudados. Para isso, foram realizadas provas de estabilidade das emulsões formadas dos diferentes extratos (Tabela 3). *Chlorella* sp. PROD1 AC -N e *Scenedesmus* sp. 3PAV3 GWP apresentaram maior capacidade estabilizante quando à extração do biossurfactantes foi realizada com metanol. Estes solventes extraem na sua maioria fosfolipídios e traços de glicolipídios (MENDES et al., 2006), compostos estes que podem ser classificados como biossurfactantes (DESAI e BANAT, 1997). O teor em fosfolipídios encontrados na biomassa de *Chlorella* sp. PROD1 AC -N e *Scenedesmus* sp. 3PAV3 GWP foram respectivamente, 4,0 e 21,9%.

Chlorella sp. PROD1 AC com limitação de nitrogênio foi capaz de acumular o dobro de lipídios (39,0%) quando comparada com as demais culturas estudadas. SPOEHR e MILNER (1949) demonstraram que *Chlorella pyrenoidosa* foi capaz de acumular até 85,0% de lipídios quando cultivada com limitação de nitrogênio. Outro trabalho proposto por HU (2004), com diferentes espécies de *Chlorella* cultivadas com limitação de nitrogênio, mostrou que algumas

espécies apresentaram capacidade de acumular amido e outras acumularam predominantemente lipídios neutros.

A manipulação de fatores nutricionais para estimular a produção de biosurfactantes, vem sendo pesquisada por diversos autores (RODRIGUES et al., 2006b; YEH et al., 2005; PRUTHI e CAMEOTRA, 2003).

Tabela 3 Prova de estabilidade, medida em dia, das emulsões formadas da AE a/o para os extratos estudados

Culturas	Etanol		Metanol		Clorofórmio		Água	
	OS	OG	OS	OG	OS	OG	OS	OG
<i>Chl AC</i>	6	1	6	1	3	6	9	3
<i>Chl AC –N</i>	3	2	247	204	3	0	106	11
<i>Chl GWP</i>	3	0	8	1	3	0	6	5
<i>Sc GWP</i>	5	3	166*	3	3	1	3	3
<i>Sc R</i>	3	2	6	3	2	1	3	0

OS: análise realizada com óleo de soja; OG: análise realizada com óleo de girassol

A Figura 6 apresenta a correlação (r) da AE o/a com os componentes químicos (proteína, carboidratos, lipídios, fosfolipídios, clorofila a e b, carotenóides e feopigmentos) presentes nos extratos estudados de *Chlorella* sp. PROD1 OR e *Scenedesmus* sp. 3PAV3.

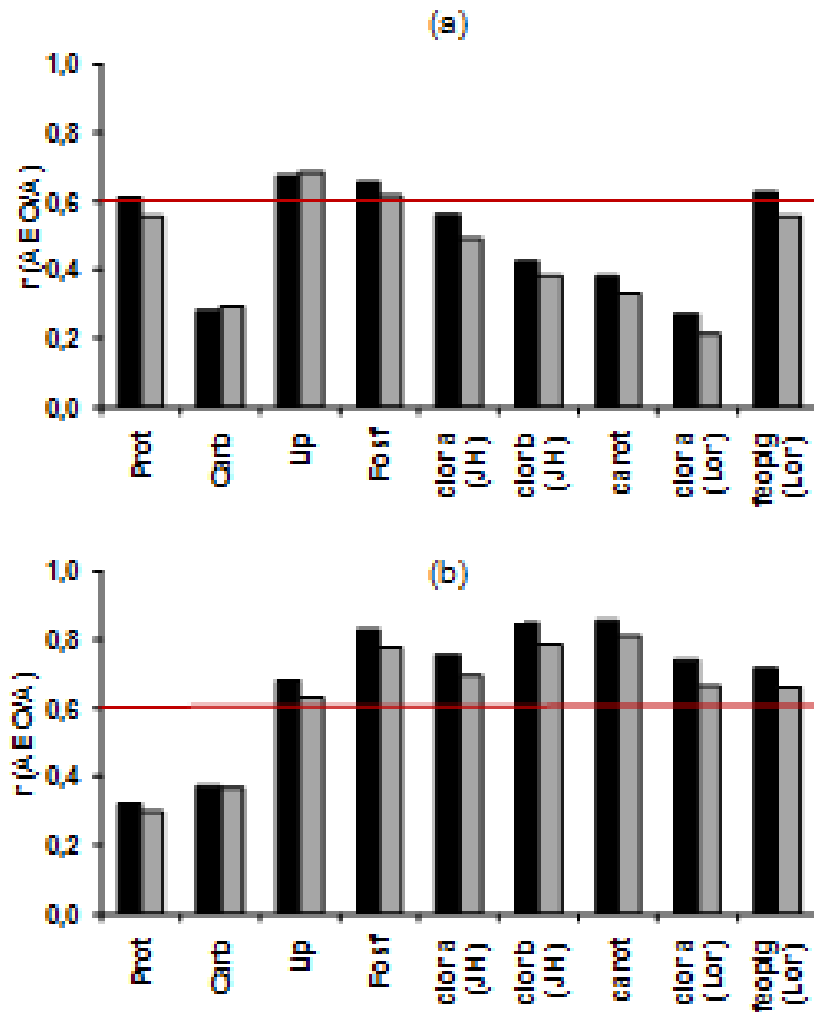


Figura 6 Correlação da AE o/a com os componentes químicos presentes nos extratos estudados para (a) *Chlorella* sp. PROD1 e (b) *Scenedesmus* sp. 3PAV3: (■) óleo de soja; (▣) óleo de girassol. A linha vermelha representa a correlação significativa ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

A microalga *Chlorella* sp. PROD1 apresentou correlação positiva ($p < 0,05$) de AE o/a com teor de proteínas, lipídios, fosfolipídios e feopigmentos. Já a microalga *Scenedesmus* sp. 3PAV3 apresentou correlação positiva ($p < 0,05$) de AE o/a com quase todos componentes químicos analisados, exceto para proteínas e carboidratos.

Os bioemulsificantes de alta massa molecular são mais efetivos para estabilizar emulsões o/a, enquanto que os de baixa massa molecular reduzem as tensões superficiais e interfaciais (ROSENBERG & RON, 1999). Biossurfactantes geralmente exibem capacidade

emulsificante, mas nem todos bioemulsificantes reduzem a tensão superficial (KARANTH et al., 1999).

Os menores valores de tensões superficiais variaram de 27,3 a 56,7 mN.m⁻¹ (Tabela 4), respectivamente para as microalgas estudadas. Um eficiente surfactante pode diminuir a tensão superficial da água de 72,0 para 35,0 mN.m⁻¹ e a tensão interfacial (tensão entre líquidos não polares e polares) da água contra n-hexadecano de 40,0 para 1,0 mN.m⁻¹ (MULLIGAN, 2005). Os resultados de tensões obtidos mostraram que as microalgas apresentam capacidade em produzir biosurfactantes.

Tabela 4 Tensão superficial (TS, mN.m⁻¹) para as microalgas estudadas

Culturas	Etanol	Metanol	Clorofórmio	Água
<i>Chl AC</i>	29,5±0,64	29,1±0,33	28,9±0,30	37,6±0,70
<i>Chl AC -N</i>	29,5±0,20	30,0±0,08	27,3±0,16	39,1±0,18
<i>Chl GWP</i>	39,5±0,47	35,9±0,68	29,5±0,75	40,1±0,69
<i>Sc GWP</i>	31,2±0,28	29,2±0,40	56,7±0,83	43,0±0,28
<i>Sc R</i>	29,5±0,15	30,4±0,20	31,4±0,14	42,8±0,58

Biosurfactantes produzido por *Pseudomonas aeruginosa* apresentou valor mínimo de tensão superficial de 25 mN.m⁻¹ (TURKOVSKAYA et al., 2001). MAKKAR e CAMEOTRA (2001) estudaram a produção de biosurfactantes através de uma cultura mesófila de *Bacillus subtilis* e a tensão superficial reduziu para valores menores que 30 mN.m⁻¹ em 24 h de cultivo.

PINTO (2008) avaliou o cultivo semi-sólido de *Corynebacterium aquaticum* e *Aspergillus fumigatus* em biorreator de coluna e em erlenmeyer, e verificou que a bactéria *C. aquaticum* mostrou-se mais eficiente na redução das tensões superficiais (31,3 mN.m⁻¹) e interfaciais (6,2 mN.m⁻¹) do que o fungo *A. fumigatus*. Por outro lado, o fungo apresentou melhores resultados com relação à atividade emulsificante. O tipo de biorreator influenciou (p<0,05) as respostas de tensão e atividade emulsificante.

CERQUEIRA (2007) estudou a produção de biosurfactantes por *Aspergillus fumigatus* em biorreatores de colunas verificando redução de até 36,2 mN.m⁻¹ de tensão superficial e 15,5 mN.m⁻¹ de tensão interfacial.

PRUTHI e CAMEOTRA (2003) avaliaram a produção de biosurfactantes por *Pseudomonas putida* e verificaram diminuição da tensão superficial para 30,6 mN.m⁻¹.

Vários estudos relacionados com a produção de biossurfactantes vêm sendo realizados, utilizando diferentes espécies de fungos, bactérias e leveduras. A literatura não apresenta relatos de produção de biossurfactantes por microalgas, o que torna este trabalho de extrema relevância. Os resultados demonstraram que as microalgas apresentam, além de tantas outras potencialidades, grande capacidade em produzir biossurfactantes.

4.3.6 CONCLUSÕES

A microalga *Chlorella* sp. PROD1 cultivada em GWP apresentou valor de AE o/a ($258,2 \text{ UE.g}^{-1}$) semelhante ao encontrado para o emulsificante comercial lecitina de soja (257 UE.g^{-1}), quando foi utilizada água como solvente extrator. *Scenedesmus* sp. 3PAV3 e *Chlorella* sp. PROD1 alcançaram valores de tensões superficiais abaixo de 30 m.N.m^{-1} .

Os resultados demonstraram a potencialidade das microalgas estudadas na produção de biossurfactantes, tanto pela redução da tensão superficial, como pelo aumento da atividade emulsificante, confirmando uma possível aplicação como emulsificante, detergente, lubrificante, estabilizante, entre outras.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e à equipe do Prof. Dr. Mario R. Tredici da Università degli Studi di Firenze (Itália) pela acolhida no desenvolvimento do trabalho.

4.3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIGOGNO, C.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; COHEN, Z. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry*, 60, 497–503, 2002.

BOROWITZKA, M. A. Algal growth media and sources of culture. In: BOROWITZKA, M. A. e BOROWITZKA, L. J., eds, *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, 456-465, 1988.

CERQUEIRA, V.S. Produção de biossurfactantes e lipase por *Aspergillus fumigatus* cultivado em estado sólido e avaliação da biorremediação em derrames de óleos e derivados. Dissertação de mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande/RS, 2007.

CEVC, G. *Phospholipids – Handbook*. Marcel Dekker, Inc. New York, EUA. 1993.

CHAUTON, M. S.; STORSETH, T. R.; KRANE, J. Analysis of whole cells of *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae), and comparison with analysis of lipophilic extracts. *Journal of Phycology*, 40, 611-618, 2004.

CHINI ZITTELLI, G.; PASTORELLI, R.; TREDICI, M. R. A Modular Flat Panel Photobioreactor (MFPP) for indoor cultivation of *Nannochloropsis* sp. under artificial illumination. *J Appl Phycol* 12:521–526, 2000.

CHINI ZITTELLI, G.; RODOLFI, L.; BIONDI, N.; TREDICI, M. R. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture*, 261,932–943, 2006.

CHINI ZITTELLI, G.; SOMIGLI, S.; RODOLFI, L.; TREDICI, M. R. Outdoor mass cultivation of *Isochrysis* sp. in annular reactors. Abstracts of the First Latinoamerican Congress on Algal Biotechnology (CLABA), 25–29 October 2004, Buenos Aires, Argentina, p. 45, 2004,

DASTGHEIB, S. M. M.; AMOOZEGAR, M. A.; ELAHI, E.; ASAD, A.; BANAT, I. M. Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery. *Biotechnol Lett*, 30, 263–70, 2008.

DESAI, J. D.; BANAT I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Rev*, 61, 47–64, 1997.

- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.*, 28 (3), 350–356, 1956.
- HU, Q. Environmental effects on cell composition. In: Richmond A, editor. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Blackwell Science Ltd, p 83–93, 2004.
- JEFFREY, S. W.; HUMPHREY, G. F. New spectrophotometric equation for determining chlorophyll a, b, c1 and c2. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 167, 194-204, 1975.
- JOHNSON, V.; SIGH, M.; SAINI, V. S. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *Biotechnology letters*, 1992.
- KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K. Microbial production of biosurfactant and their importance. *Current Science*, 77, 1, 116-126, 1999.
- KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. *Pure and Applied Chemistry*, 64, 11, 1731-1737, 1992.
- LORENZEN, C. J. Determination of Chlorophyll and Pheo-Pigments: Spectrophotometric Equations. *Limnology and Oceanography*, 12, 2, 343-346, 1967.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1975.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Synthesis of enhanced biosurfactant by *Bacillus subtilis* MTCC 2423 at 45°C by foam fractionation. *Journal of surfactants and Detergents*. 4, 4, 355-357, 2001.
- MARSH, J. B.; WEINSTEIN, D. B. Simple charring method for determination of lipids. *J. of Lipid Research*, 7, 574-576, 1966.
- MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactantes em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. *Quim. Nova*, 31, 8, 1942-1947, 2008.
- MENDES, R. L.; REIS, A. D.; PALAVRA, A. F. Supercritical CO₂ extraction of c-linolenic acid and other lipids from *Arthrospira (Spirulina) maxima*: Comparison with organic solvent extraction. *Food Chemistry*, 99, 57–63, 2006.
- MULLIGAN, C. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133, 183-198, 2005.

- PARSONS, T. R.; STRICKLAND, J. D. H. Discussion of spectrophometric determination of marine-plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophyll-a and carotenoids. *Journal Marine Research*, 21, 105-156, 1963.
- PINTO, M. H. Produção de biossurfactantes bacteriano e fúngico por fermentação em estado sólido e submersa utilizando resíduos agroindustriais. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande/RS, 2008.
- PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S.S. Effect of nutrients on optimal production of biosurfactants by *Pseudomonas putida* – a gujarat oil field isolate. *Journal of Surfactants and Detergents*, 6, 1, 65-68, 2003.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111, 1–61, 1979.
- RODOLFI, L.; CHINI ZITTELLI, G.; BARSANTI, L.; ROSATI, G.; TREDICI, M. R. Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. Mass cultivation. *Biomol. Eng.* 20, 243–248, 2003.
- RODOLFI, L.; CHINI ZITTELLI, G.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and *Outdoor* Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 1, 100-112, 2009.
- RODRIGUES, L.; MOLDES, A.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus strains*. *Biochemical Engineering Journal*. 28, 109-116, 2006a.
- RODRIGUES, L.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R.; VAN DER MEI, H. C. Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. *Process Biochemistry*, 41, 1-10, 2006b.
- ROSENBERG, E.; RON, E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 154-162, 1999.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial*, vol.2. Edgard Blücher LTDA, São Paulo, pp. 93–122, 2001.
- SPOEHR, H. A.; MILNER, H. W. The chemical composition of *Chlorella*: Effect of environmental conditions. *Plant Physiol*, 24, 120–149, 1949.

STEWART, J. M. C. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal. Biochem.*, 104, 10, 1980.

SZUHAI, B. F. Lecithins sources, manufacture & uses. *American Oil Chemists' Society.*, 74-76, 1989.

TREDICI M. R.; RODOLFI, L. Reactor for industrial culture of photosynthetic micro-organisms. Patent WO 2004/074423 A2 to Università degli Studi di Firenze, 2004.

TREDICI, M. R.; MATERASSI, R. From open ponds to vertical alveolar panels: the Italian experience in the development of reactors for the mass cultivation of phototrophic microorganisms. *J. Appl. Phycol.* 4, 221–231, 1992.

TURKOVSKAYA, O. V.; DMITRIEVA, T. V.; MURATOVA, A. Y. A biosurfactant producing *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 37, 71-75, 2001.

XUE, C.; HU, Y.; SAITO, H.; ZHANG, Z.; LI, Z.; CAI, Y.; OU, C.; LIN, H.; IMBS, A. B. Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*, 77, 9–13, 2002.

YEH, M.S.; WEI, Y.H.; CHANG, J.S. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. *Biotechnology Progress*, 21, 1329-1334, 2005.

4.4 CULTIVO OUTDOOR DA MICROALGA MARINHA *TETRASELMIS SUECICA* OR PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

Elisângela M. Radmann¹, Natascia Biondi², Mario R. Tredici², Jorge A. V. Costa^{1*}

¹ Laboratório de Engenharia Bioquímica, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Caixa Postal 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil. Fax: +55-53-3233 8745. E-mail: jorge@pq.cnpq.br

² Departamento de Biotecnologia Agrária, Università degli Studi di Firenze, P.le delle Cascine 24, 50144 Firenze, Italia.

4.4.1 RESUMO

As microalgas se destacam por apresentar diversas potencialidades, como fonte de alimentos e fonte para obtenção de bioprodutos. Estudos sobre a utilização de microalgas são recentes e promissores, carecendo estudos mais detalhados visando preencher lacunas de seu uso como inovador tecnológico e fornecedor de subprodutos e extratos. Neste trabalho foi estudada a capacidade da microalga *Tetraselmis suecica* OR em produzir compostos de superfície ativa, biossurfactantes. *T. suecica* OR foi cultivada em condições *outdoor* em fotobiorreatores do tipo *Green Wall Panel* (GWP). *T. suecica* OR alcançou produtividade volumétrica de 0,37 g.L⁻¹.d⁻¹ tanto para cultura controle e quanto para cultura com limitação de nitrogênio. Maiores valores de atividade emulsificante óleo/água foram encontrados quando a extração do biossurfactantes foi realizada com etanol e água. Menores valores de tensões superficiais foram alcançados para cultura com limitação de nitrogênio. Os resultados mostraram a potencialidade da microalga na produção de biossurfactantes.

Palavras-chave: Biossurfactantes, *Green Wall Panel*, *Tetraselmis*.

4.4.2 ABSTRACT

The microalgae have several potential as a food and bioproducts source. Studies about the use of microalgae is recent and promising, but require more detailed Studies to fill gaps in its use as a technology innovator and supplier of products and extracts. In this work, we Studied the ability of microalgae *Tetraselmis suecica* OR to produce surface active compounds, biosurfactants. *T. suecica* OR was grown in outdoor *Green Wall Panel* (GWP) photobioreactor. The volumetric productivity of *T. suecica* OR reached 0.37 g L⁻¹ d⁻¹ for both culture control and culture with nitrogen limitation. Higher values of emulsifying activity oil/water were found when the extraction of the biosurfactant was performed with ethanol and water. Lower values of surface tensions were achieved for the culture with nitrogen limitation. The results showed the potential of microalga for the production of biosurfactants.

Keywords: Biosurfactants, Green Wall Panel, *Tetraselmis*.

4.4.3 INTRODUÇÃO

Tetraselmis é uma microalga marinha flagelada, utilizada na aquicultura como alimento para moluscos, larvas e peixes (CHINI ZITTELLI et al., 2006; MULLER-FEUGA et al., 2003; FÁBREGAS et al., 1997) e na alimentação humana e animal como fonte de vitamina E (CARBALLO-CÁRDENAS et al., 2003). Possui atividade antimicrobiana (AUSTIN et al., 1992) e elevado potencial probiótico (IRIANTO e AUSTIN, 2002). Esta microalga tem sido estudada visando a produção de lipídios (CHINI ZITTELLI et al., 2006) e biofixação de CO₂ (MATSUMOTO et al., 1995).

Ampliando os estudos com a microalga *Tetraselmis*, neste trabalho foi estudada a capacidade da microalga em produzir biossurfactantes. Estes são produzidos na superfície da célula microbiana ou excretados extracelularmente, e tem a capacidade de reduzir tensões superficiais e interfaciais (DYKE et al., 1991). Os biossurfactantes têm sido bastante estudados por apresentar vantagens de baixa toxicidade, biodegradabilidade e propriedades biológicas, frente aos surfactantes sintéticos, que na sua maioria são derivados de petróleo.

Os biossurfactantes compreendem uma ampla variedade de estruturas químicas como glicolipídios, lipopeptídios, lipoproteínas, lipídios neutros, ácidos graxos e fosfolipídios (DESAI e BANAT, 1997). Estes compostos que podem ser produzidos por microalgas através do uso de diferentes fontes de carbono, nitrogênio e fósforo. A produção de biossurfactantes também pode ser influenciada pelas condições de cultivo como pH, temperatura e agitação (BANAT, 1995). Associado a estes fatores, o tipo de fotobiorreator e sua operação podem influenciar a produção destes compostos bioativos e a qualidade do produto final. Além da avaliação das possibilidades e potencialidades dos cultivos de microalgas, a viabilização da produção destes micro-organismos em larga escala é de fundamental importância, devendo-se para isto, a obtenção de parâmetros de processo que possam ser levados à escala industrial e sejam economicamente viáveis.

O fotobiorreator do tipo *Green Wall Panel* (GWP) utilizado neste trabalho foi desenvolvido por TREDICI e RODOLFI (2004) na empresa Fotosintetica & Microbiologica s.r.l. da Università degli Studi di Firenze (UNIFI) na Itália. Apresenta vantagens como baixo custo de produção, baixa contaminação, altas produtividades, etc. São bastante utilizados na produção de lipídios por *Nannochloropsis* (RODOLFI et al., 2009). Este fotobiorreator já é utilizado em vários países como Chile, Portugal, Itália.

Observando estes aspectos, o objetivo deste trabalho foi produzir biomassa rica em biossurfactantes pela microalga *Tetraselmis suecica* OR através de diferentes condições de cultivo.

4.4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.4.1 Micro-organismo e condições de cultivo

Tetraselmis suecica OR da coleção de cultura do Departamento de Biotecnologia Agrária da Università degli Studi di Firenze (Itália) foi cultivada em *Green Wall Panel* – GWP, em meio F (GUILLARD e RYTHER, 1962), preparado com água do mar artificial (salinidade de 30 g.L⁻¹) e com adição de soluções nutrientes estéreis. Foram realizados dois cultivos: um como controle, utilizando meio de cultivo F completo e outro com limitação de nitrogênio (-N). NaNO₃ e NaHPO₄, foram adicionados ao cultivo controle de acordo com o crescimento microalgal, considerando-se que N e P representam 10% e 1% da biomassa, respectivamente (RODOLFI et al., 2009). Para a cultura com limitação de nitrogênio, o procedimento foi o mesmo, mas sem adição de NaNO₃. Diariamente foi realizada análise de nitrogênio e fósforo.

CO₂ foi injetado aos cultivos durante o dia para fornecer carbono às culturas e controlar o pH 8,0 ± 0,2. A temperatura diurna foi controlada através de um termostato imerso nas culturas com ativação automática de água corrente por um tubo de aço inox de 0,6 cm de diâmetro, quando a temperatura ultrapassasse 27°C. Durante a noite, as temperaturas das culturas não foram controladas. O sistema de cultivo semicontínuo foi adotado para os dois ensaios de *T. suecica* OR. Diariamente, no início do dia, uma fração pré-determinada (30%) de cultura foi retirada e substituída pelo mesmo volume com meio de cultivo novo. O volume das culturas foram de 23,5 L.



Figura 1 Fotobiorreatores do tipo *Green Wall Panel*

Fonte: Centro Nacional de Pesquisa – Pólo Científico – UniFI (Itália)

4.4.4.2 Determinações analíticas

O crescimento das culturas foi acompanhado através da medida da concentração de biomassa em peso seco (CHINI ZITTELLI et al., 2000) e contagem em câmara de Bürker para posterior cálculo do peso da célula. A produtividade da biomassa de *Tetraselmis suecica* OR (P , $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) foi obtida segundo a equação $P = (X_t - X_0)/(t - t_0)$, onde X_t é a concentração de biomassa (g.L^{-1}) no tempo t (d), e X_0 a concentração de biomassa (g.L^{-1}) no tempo t_0 (d) que representa o início de cada ciclo (SCHMIDELL et al., 2001).

4.4.4.3 Análise de Amido

Ao final dos cultivos foi realizada, análise qualitativa de amido através da adaptação do método de *Testing A Leaf For Starch*. A cultura fresca foi colocada em tubo de ensaio e submetida à água fervente (banho-maria), interrompendo a atividade bioquímica das células, facilitando a remoção de clorofila e a entrada de iodo. Logo após foi colocado junto à cultura, algumas gotas de etanol, e novamente colocado em água fervente (banho-maria), eliminando a clorofila. Em seguida aplicou-se de 2 a 3 gotas de solução de iodeto de potássio, verificando a presença ou ausência de amido: a cor preto-azulado indica presença de iodo (o iodo penetra na molécula de amido alterando sua cor) e a cor morrom-amarelado (cor da solução de iodo) indica ausência de amido.

4.4.4.4 Caracterização da biomassa produzida

A biomassa produzida foi centrifugada e liofilizada para posterior caracterização e extração de biossurfactantes. A biomassa foi caracterizada quanto ao teor de clorofila (JEFFREY e HUMPHREY, 1965), feopigmentos, carotenóides (PARSONS e STRICKLAND, 1963), proteína (LOWRY et al, 1951), carboidratos (DUBOIS et al, 1956), lipídios (MARSH e WEINSTEIN, 1966) e fosfolipídios (STEWART, 1980).

4.4.4.4.1 Estudo da extração do biossurfactantes

Foram estudados diferentes tipos de solventes nas extrações dos biossurfactantes de *Tetraselmis suecica* OR, utilizando a mesma proporção de 0,1:7,5 (biomassa seca: água) em todas extrações estudadas. Os extratos obtidos foram utilizados para as análises de atividade emulsificante, tensão superficial e tensão interfacial.

4.4.4.4.2 Extração com etanol, metanol ou clorofórmio

A extração foi realizada com etanol, metanol ou clorofórmio e quartzo em agitador de tubos (5 min) e banho ultrassônico (20 min), para rompimento da parede celular, seguido de agitação em agitador magnético durante 5 h. Logo após passou por centrifugação e evaporação com resuspensão em água, obtendo-se 3 tipos de extratos.

4.4.4.4.3 Extração com água

A extração foi realizada com água em sonda ultrassônica (20 min), para rompimento da parede celular, seguida de agitação em agitador magnético durante 5 h. Logo após passou por centrifugação.

4.4.4.5 Caracterização dos extratos

Para caracterização dos extratos obtidos, foram realizadas as análises de clorofila (LORENZEN, 1967; JEFFREY e HUMPHREY, 1965), feopigmentos, carotenóides (PARSONS e STRICKLAND, 1963), proteína (LOWRY et al, 1951), carboidratos (DUBOIS et al, 1956), lipídios (MARSH e WEINSTEIN, 1966) e fosfolipídios (STEWART, 1980).

A caracterização dos extratos foi realizada a fim de estimar o tipo de biossurfactantes presente nos mesmos.

4.4.4.6 Estimativa da atividade biossurfactantes

A estimativa da atividade biossurfactantes foi realizada através da medida das tensões superficial e interfacial e através das atividades emulsificantes óleo em água e água em óleo.

4.4.4.6.1 Tensão superficial e interfacial

A análise de tensão superficial e interfacial foi realizada em tensiômetro (Kruss Processor Tensiometer K-6, Alemanha) usando o método do anel, sendo a tensão medida com a amostra em contato com o ar (RODRIGUES et al., 2006). Neste método, um recipiente contendo a amostra a ser analisada é suspenso até que o contato com a superfície do anel seja registrado. O contato da amostra com o anel é desfeito, de maneira que o filme líquido produzido abaixo do anel é alongado, sendo determinada a força máxima necessária para a extensão do filme, obtendo-se a tensão superficial (RODRIGUES et al., 2006). A tensão superficial foi medida com a amostra em contato com o ar, e a tensão interfacial com a amostra em contato com hexadecano.

4.4.4.6.2 Atividades emulsificantes óleo/água e água/óleo

Foi realizada uma análise de atividade emulsificante óleo/água com diferentes óleos, verificando àquele que melhor se ajustava ao método. Foram testados os óleos de soja, girassol, amendoim, milho e óleo lubrificante. Os óleos que melhor se ajustaram ao método foram os óleos de soja (96%) e de girassol (97%), apresentando transmitância próxima de 100%. As análises de atividade emulsificante foram realizadas em sextuplicata.

As atividades emulsificantes óleo/água e água/óleo foram determinadas utilizando-se a proporção de 2,1:1,4 (água:extrato) e 2 mL de óleo de soja ou girassol. A mistura foi agitada em agitador vortex a 700 rpm por 1 min.

Após 60 min de repouso foi medida a transmitância do meio emulsificado óleo/água em espectrofotômetro (Varian, Mulgrave/Austrália) a 610 nm (JOHNSON et al., 1992), passando-se este valor para absorvância, e diminuindo-se da absorvância do branco (3,5 ml de

água destilada e 2 ml de óleo de soja ou girassol), obtida a partir da leitura da amostra diluída. A atividade emulsificante óleo em água foi obtida através da Equação 1.

$$AE_{(O/A)} = (Abs.D) / ((m.(1-U))) \quad (1)$$

Após 24 h de repouso foi realizada leitura da altura da emulsão água/óleo formada e da altura total (altura da emulsão mais altura da camada remanescente de óleo) (BRODERICK & COONEY, 1982), obtendo-se a atividade emulsificante água em óleo de acordo com a Equação 2. O branco foi preparado misturando-se 3,5: 2 (água: óleo) mL, procedendo da mesma forma que para a amostra.

$$AE_{(A/O)} = (E.D) / ((m.(1-U))) \quad (2)$$

Onde:

$AE_{O/A}$ = atividade emulsificante óleo/água ($UE.g^{-1}$);

$AE_{A/O}$ = atividade emulsificante água/óleo ($UE.g^{-1}$);

Abs = absorbância da emulsão óleo/água;

D = diluição da amostra em água;

m = massa da amostra úmida (g);

U = umidade do meio;

E = relação centesimal entre a altura da emulsão e a altura total.

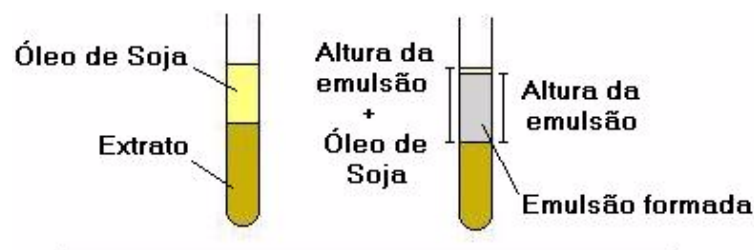


Figura 2 Representação esquemática do ensaio da atividade emulsificante

Fonte: Martins (2005)

A atividade emulsificante óleo em água foi definida como a quantidade de biossurfactantes necessário para aumentar a absorbância em 1,0 a 610 nm. A atividade emulsificante água em óleo como a quantidade de biossurfactantes necessário para manter a emulsão estável por 24 h (MARTINS et al. 2008).

4.4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho *Tetraselmis suecica* OR foi cultivada em fotobiorreator GWP durante o verão, quando a temperatura diurna variou de 10 a 27°C. Ambos os cultivos apresentaram comportamento de crescimento semelhante até 4 dias (Figura 4) e após a cultura com limitação de nitrogênio (-N) começou a diminuir a produtividade (Tabela 1), entrando na fase estacionária de crescimento e apresentando alteração na coloração da cultura (Figura 3). Entretanto, em 7 dias os cultivos foram finalizados. A maioria dos biossurfactantes é liberada no meio de cultura na fase exponencial ou na fase estacionária do crescimento microbiano (MAKKAR e CAMEOTRA, 2001).

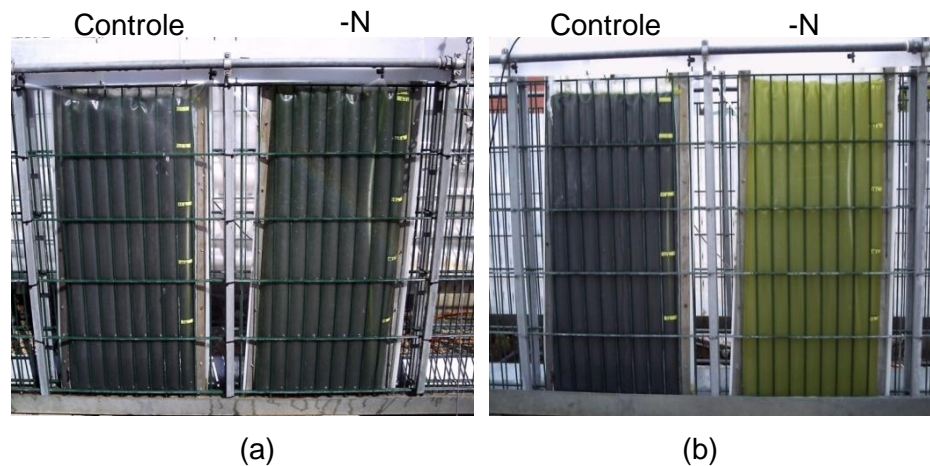


Figura 3 Cultivo de *Tetraselmis suecica* OR: (a) t=0 e (b) t=15 d

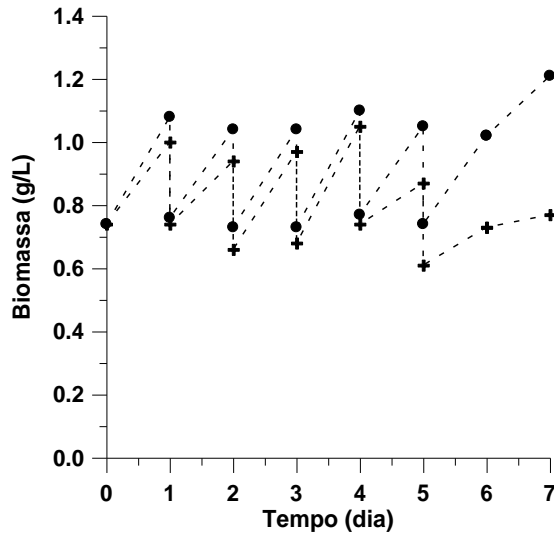


Figura 4 Curvas de crescimento para os cultivos de *T. suecica* OR: (●) cultura controle e (+) cultura com limitação de N

Os fotobiorreatores utilizados no presente trabalho *Green Wall Panel* já foram utilizados em trabalhos de produção de lipídios pela microalga marinha *Nannochloropsis* sp. F&M-M24. Um dos trabalhos foi realizado por RODOLFI et al. (2009), com um cultivo controle e outro cultivo com limitação de nitrogênio, alcançando 0,36 e 0,30 g.L⁻¹.d⁻¹ de produtividade e, 32 e 60% de lipídios, respectivamente, para *Nannochloropsis* sp. F&M-M24. Produtividades estas semelhantes às encontradas para a *T. suecica* OR no presente trabalho. Já o teor de lipídios encontrado para *T. suecica* OR foi de 25,1 e 22,1% para o cultivo controle e com limitação de N, respectivamente.

Várias espécies de *Tetraselmis* já foram cultivadas *outdoor*, tanto em tanques abertos (PEDRONI et al., 2004; MATERASSI et al., 1983) quanto em biorreatores em escala piloto (PEDRONI et al., 2004; BOROWITZKA, 1997), sendo registrados nestes últimos, dados de produtividade de até 1,2 g.L⁻¹.d⁻¹. PEDRONI et al. (2004) compararam, durante um período de vários meses, o desempenho de *T. suecica* em fotobiorreator tubular horizontal e em Raceway, utilizando gás de combustão como fonte de carbono. Os dois sistemas de cultivo apresentaram produtividades semelhantes. Apesar de poucos trabalhos serem realizados quanto a comparação dos fotobiorreatores utilizados em cultivo *outdoor*, observa-se que em fotobiorreatores fechados a produtividade é mais elevada que em Raceways (TREDICI e MATERASSI, 1992).

Tabela 1 Concentração de biomassa (X, g.L⁻¹), produtividade volumétrica (P, g.L⁻¹.d⁻¹), peso da célula (PC, pg), concentração de nitrogênio (XN, mg), concentração de fósforo (XP, mg) para os ensaios realizados com *T. suecica* OR (controle e com limitação de N).

Tempo (dia)	CONTROLE					Limitação de N				
	X	P	PC	XN	XP	X	P	PC	XN	XP
0	0,74		171	49,2	4,9	0,74	0,26	171	19,2	1,9
1	1,08	0,34	-	58,9	5,1	1,00	0,24	-	0,2	5,0
2	1,04	0,28	167	41	4,1	0,94	0,31	177	0	4,1
3	1,04	0,31	133	32	3,2	0,97	0,37	210	0	3,2
4	1,10	0,37	144	23,0	2,5	1,05	0,13	256	0	2,5
5	1,05	0,28	137	50	5,0	0,87	0,12	300	0	5,8
6	1,02	0,28	119	22	2,2	0,73	0,04	347	0	4,6
7	1,21	0,19	144	-	-	0,77		266	-	-

Controle: cultura utilizada como controle; -N: cultura com limitação de nitrogênio

Este trabalho demonstrou que a microalga *T. suecica* OR possui grande capacidade em acumular carboidratos quando cultivada com limitação de fonte de nitrogênio, alcançando 52,5%. Com suficiência de nutrientes (cultivo controle) *T. suecica* OR apresentou maior concentração de proteínas (51,7%).

Para confirmar o elevado teor em carboidratos encontrado para *T. suecica* OR cultivada com limitação de nitrogênio, foi realizada análise de amido (Figura 5). A coloração preto-azulada apresentada nas células da Figura 5b mostra a presença de grande quantidade de amido, o que não se observa na Figura 5a (cultura controle), onde as células apresentaram cor marrom-amarelada, indicando ausência quase que total de amido. Este fato pode ser explicado por FOGG (1983), onde relata que em condições de limitação de nutrientes e fatores físico-químicos, que dificultem a divisão e a estruturação da célula, ocorre excesso de “carbono fotoassimilado”, que seria então desviado para a produção de carboidratos. Importante também salientar a diferença de peso entre as células das diferentes culturas, apresentando duplicação do peso das células (347 pg) da cultura com limitação de nitrogênio em relação ao peso inicial (t=0), já para a cultura controle o peso celular diminuiu.

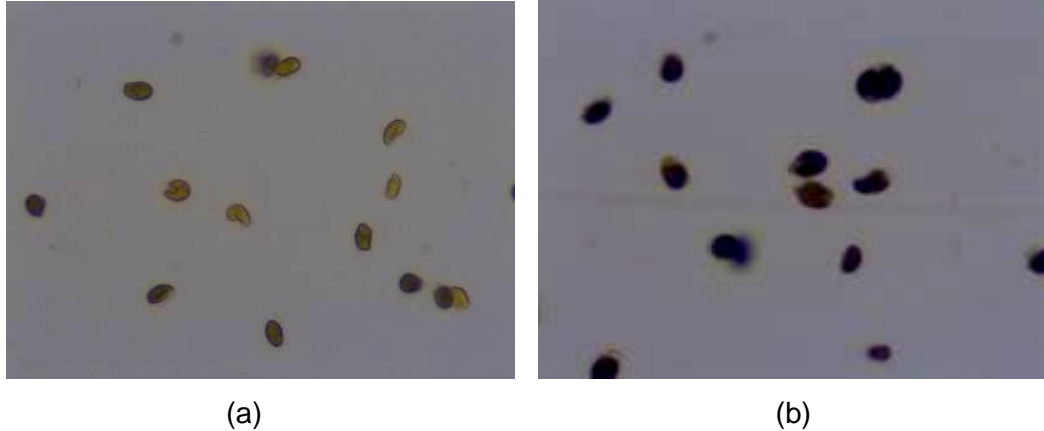


Figura 5 Análise de amido final na cultura de *T. suecica* OR – cultura em GWP: (a) Controle (b) com limitação de N

Quanto à análise de atividade emulsificante óleo/água (AE o/a), para os extratos de *T. suecica* OR cultivada em diferentes condições, os maiores resultados foram encontrados quando a extração dos bioativos foi realizada com água para a cultura controle, e para a cultura com limitação de nitrogênio, maiores valores de AE o/a foram encontrados quando a extração foi realizada com etanol (Tabela 2). Os valores de AE o/a encontrados são superiores aos alcançados por VEENANADIG et al. (2000) ao produzir bioativos em biorreatores de colunas a partir de *Bacillus subtilis* (AE o/a máxima de $1,9 \text{ UE.g}^{-1}$). MARTINS et al. (2008) estudou a produção de bioativos por fermentação em estado sólido utilizando o fungo *Aspergillus fumigatus* EFB1 e este apresentou AE o/a de $12,33 \text{ UE.g}^{-1}$. CERQUEIRA (2007) também estudou a produção de bioativos pelo fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus* cultivado em estado sólido, testando diferentes meios fermentativos, taxas de aeração e fonte adicional de carbono. Os resultados obtidos mostraram que a maior AE a/o foi de $25,49 \text{ UE.g}^{-1}$ e AE o/a de $58,51 \text{ UE.g}^{-1}$.

Tabela 2 Resultados de AE óleo/água (UE.g⁻¹) para *T. suecica* OR e coeficiente de variação da análise.

Extrato	Controle				Limitação de N			
	Óleo de soja		Óleo de girassol		Óleo de soja		Óleo de girassol	
	AE o/a	c.v	AE o/a	c.v	AE o/a	c.v	AE o/a	c.v
Etanol	126±15,9	12,6	115,5±13,5	11,7	117,2±3,8	3,2	112,5±6,2	5,6
Metanol	120,6±16,0	13,3	96,2±7,4	7,7	53,3±6,2	11,6	60,3±4,3	7,2
Clorofórmio	22,0±1,7	7,9	21,4±1,8	8,4	29,5±2,4	8,0	29,1±3,3	11,4
Água	152,8±16,9	11,0	175,3±18,7	10,6	96,3±6,1	6,3	94,7±8,8	9,3

Controle: cultura utilizada como controle; -N: cultura com limitação de nitrogênio; c.v (%) - coeficiente de variação da análise

Os valores de atividade emulsificante água/óleo (AE a/o) para todos os extratos estudados para *T. suecica* OR apresentaram valores semelhantes de 45 a 48 UE.g⁻¹. As emulsões água/óleo são estabilizadas pela presença de lipídios polares e proteínas que se encontram na interface água/óleo. Este pode ser um dos motivos da obtenção de baixos valores de AE a/o para todos os extratos estudados. Para isso, foram realizadas provas de estabilidade das emulsões formadas dos diferentes extratos (Tabela 3).

Tabela 3 Prova de estabilidade (dia) das emulsões formadas da AE a/o para os extratos estudados

Extrato	Controle		Limitação de N	
	Soja	Girassol	Soja	Girassol
Etanol	222	2	10	10
Metanol	222	2	179	6
Clorofórmio	2	2	3	3
Água	3	2	3	3

Controle: cultura utilizada como controle; -N: cultura com limitação de nitrogênio

De acordo com BATISTA et al. (2006), a capacidade de estabilização de uma emulsão é a habilidade em manter pelo menos 50% do volume da emulsão original 24 h depois da sua formação.

Os extratos que apresentaram maior capacidade de estabilização das emulsões A/O foram àqueles realizados com etanol e metanol. Estes solventes extraem na sua maioria fosfolipídios e traços de glicolipídios (MENDES et al., 2006), compostos estes que podem ser classificados como biossurfactantes (DESAI e BANAT, 1997). O teor em fosfolipídios encontrados na biomassa de *T. suecica* OR controle e com limitação de N, foram respectivamente, 24,5 e 7,1%.

A Figura 6 apresenta a correlação (r) da AE o/a com os componentes químicos (proteína, carboidratos, lipídios, fosfolipídios, clorofila a e b, carotenóides e feopigmentos) presentes nos extratos estudados de *T. suecica* OR.

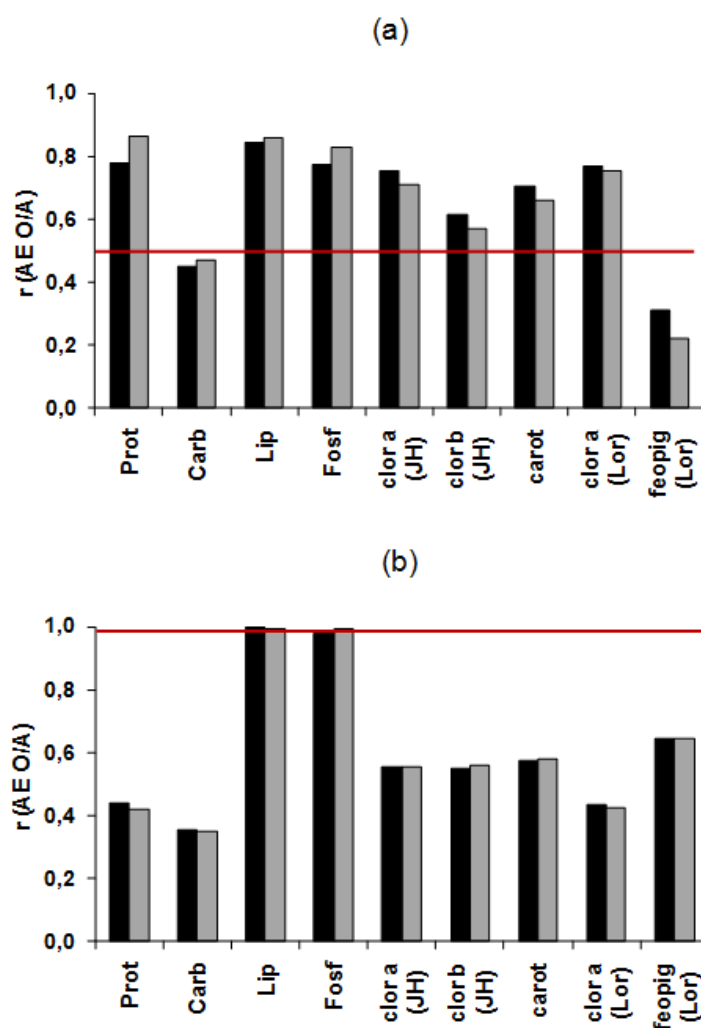


Figura 6 Correlação da AE o/a com os componentes químicos presentes nos extratos estudados para *T. suecica* OR: (a) Controle; (b) -N. (■) óleo de soja; (□) óleo de girassol. A linha vermelha representa a correlação significativa ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

Ambas as culturas de *T. suecica* OR apresentaram comportamento semelhante quando comparadas as análises feitas com óleo de soja ou girassol. No caso da cultura controle, todos compostos, com exceção de carboidratos e feopigmentos, apresentaram correlação positiva ($p < 0,05$) com AE o/a. Para cultura com limitação de N a correlação AE o/a foi positiva ($p < 0,05$) para lipídios e fosfolipídios.

A produção de biossurfactantes pode ser espontânea ou induzida pela presença de compostos lipofílicos, por variações de pH, temperatura, aeração e velocidade de agitação, ou ainda, quando o crescimento celular é mantido sob condições de estresse, como baixas concentrações da fonte de nitrogênio (DESAI E BANAT, 1997).

Tabela 4 Tensões superficiais (TS, mN.m^{-1}) e interfaciais (TI, mN.m^{-1}) para *T. suecica* OR

Extrato	Controle		Limitação de N	
	TS	TI	TS	TI
Etanol	31,7±0,31	0,9±0,21	26,0±0,12	1,2±0,00
Metanol	28,5±0,19	0,7±0,14	27,8±0,14	1,4±0,21
Clorofórmio	43,2±0,67	17,9±0,25	26,1±0,09	1,1±0,00
Água	52,6±0,69	24,1±0,49	36,3±0,72	4,1±0,30

De acordo com BATISTA et al. (2006), o critério utilizado para selecionar micro-organismos produtores de biossurfactantes é a habilidade em reduzir a tensão superficial abaixo de 40 mN.m^{-1} . Entretanto, para ambas as culturas, os resultados de tensão superficial e interfacial encontrados (Tabela 4), mostram a potencialidade de *T. suecica* OR na produção de biossurfactantes.

Os menores valores de tensão superficial e interfacial foram obtidos para *T. suecica* OR quando foi cultivada com limitação de N, confirmando que a fonte de nitrogênio é um fator muito importante na estimulação do micro-organismo à produção de biossurfactantes (DESAI e BANAT, 1997).

4.4.6 CONCLUSÕES

A microalga *T. suecica* OR alcançou produtividade de $0,37 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ para ambas culturas controle e com limitação de nitrogênio. Maiores valores de AE o/a foram encontrados quando a extração do biossurfactantes foi realizada com etanol e água. Menores valores de tensões superficiais foram alcançados para cultura com limitação de nitrogênio.

Com este trabalho foi possível verificar que a microalga marinha *T. suecica* OR apresentou potencial em produzir biossurfactantes, tanto pela baixa tensão superficial e elevados valores de atividade emulsificante, quanto sua capacidade de atuação como estabilizante de emulsões.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e à equipe do Prof. Dr. Mario R. Tredici da Università degli Studi di Firenze (Itália) pela acolhida no desenvolvimento do trabalho.

4.4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUSTIN, B.; BAUDER, E.; STOBIE, M. B. C. Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica*. *J. Fish Dis.* 15, 55–61, 1992.
- BANAT, I. M. Biosurfactants characterization and use in pollution removal: state of the art. A Review. *Acta Biotechnol*, 15, 251–67, 1995.
- BATISTA, S. B.; MOUNTEER, A. H.; AMORIM, F. R.; TOTOLA, M. R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier from petroleum-contaminated sites. *Bioresour Technol*, 97, 868–875, 2006.
- BENINCASA, M. Rhamnolipid Produced from Agroindustrial Wastes Enhances Hydrocarbon Biodegradation in Contaminated Soil. *Current Microbiology*, 54, 445-449, 2007.
- BOROWITZKA, M. A. Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *J. Appl. Phycol.* 9, 393–401, 1997.
- BROWN, L. M. Uptake of carbon dioxide from flue gas by microalgae. *Energy Convers. Mgmt.*, 37, 1363-136, 1996.
- CARBALLO-CÁRDENAS, E. C.; TUAN, P. M.; JANSSEN, M.; WIJFFELS, R. H. Vitamin E (α -tocopherol) production by marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomol. Eng.* 20, 139–147. 2003.
- CERQUEIRA, V. S. Produção de biossurfactantes e lipase por *Aspergillus fumigatus* cultivado em estado sólido e avaliação da biorremediação em derrames de óleos e derivados. Dissertação de mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos –Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande-RS, 2007.
- CHINI ZITTELLI G.; PASTORELLI, R.; TREDICI, M. R. A Modular Flat Panel Photobioreactor (MFPP) for indoor cultivation of *Nannochloropsis* sp. under artificial illumination. *J Appl Phycol* 12:521–526, 2000.
- CHINI ZITTELLI, G.; RODOLFI, L.; BIONDI, N.; TREDICI, M. R. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture*, 261, 932–943, 2006.

- COSTA, J. A. V.; RADMANN, E. M.; CERQUEIRA, V. S.; SANTOS, G. C.; CALHEIROS, M. N. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 17, 4, 429-436, 2006.
- CROSMAN, J. T.; PINCHUK, R. J.; COOPER, D. G. Enhanced biosurfactant production by *Corynebacterium alkanolyticum* ATCC 21511 using self-cycling fermentation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 79, 5, 467-472, 2002.
- DESAI, J. D.; BANAT I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Rev*, 61, 47-64, 1997.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.*, 28 (3), 350-356, 1956.
- DYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Applications of Microbial Surfactants. *Biotechnology Advances*, 9, 241-252. 1991.
- FÁBREGAS, J., ARÁN, J., MORALES, E.D., LAMELA, T., OTERO, A., Modification of sterol concentration in marine microalgae. *Phytochemistry*, 46, 1189-1191, 1997.
- FOGG, G. E. The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. *Bot. Mar.*, 26, 3-14, 1983.
- GUILLARD, R. R. L.; RYTHER, J. H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* (Hustedt) and *Detonula confervacea* (Cleve). *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239, 1962.
- IRIANTO, A.; AUSTIN, B., Probiotics in aquaculture. *J. Fish Dis.* 25, 633-642, 2002.
- JEFFREY, S. W.; HUMPHREY, G. F. New spectrophotometric equation for determining chlorophyll a, b, c1 and c2. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 167, 194-204, 1975.
- JOHNSON, V.; SIGH, M.; SAINI, V. S. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *Biotechnology letters*, 1992.
- LORENZEN, C. J. Determination of Chlorophyll and Pheo-Pigments: Spectrophotometric Equations. *Limnology and Oceanography*, 12, 2, 343-346, 1967.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1975.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Synthesis of enhanced biosurfactant by *Bacillus subtilis* MTCC 2423 at 45°C by foam fractionation. *Journal of surfactants and Detergents.* 4, 4, 355-357, 2001.

- MARSH, J. B.; WEINSTEIN, D. B. Simple charring method for determination of lipids. *J. of Lipid Research*, 7, 574-576, 1966.
- MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactantes em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. *Quim. Nova*, 31, 8, 1942-1947, 2008.
- MATERASSI, R.; TREDICI, M. R.; MILICIA, F.; SILI, C.; PELOSI, E.; VINCENZINI, M.; TORZILLO, G.; BALLONI, W.; FLORENZANO, G.; WAGENER, K. Development of a production size system for the mass culture of marine microalgae. In: Palz, W., Pirwitz, D. (Eds.), *Energy from Biomass*. Reidel Publishing Company, Boston, 150–158. Series E, vol. 5, 1983.
- MATSUMOTO, H.; SHIOJI, N.; HAMASAKI, A.; IKUTA, Y.; FUKUDA, Y.; SATO, M.; ENDO, N.; TSUKAMOTO, T. Carbon dioxide fixation by microalgae photosynthesis using actual flue gas discharged from a boiler. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 51/52, 681–692. 1995.
- MENDES, R. L.; REIS, A. D.; PALAVRA, A. F. Supercritical CO₂ extraction of c-linolenic acid and other lipids from *Arthrospira (Spirulina) maxima*: Comparison with organic solvent extraction. *Food Chemistry*, 99, 57–63, 2006.
- MORAIS, M, G.; COSTA, J. A. V. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 129, 3, 439-445, 2007.
- MULLER-FEUGA, A.; ROBERT, R.; CAHU, C.; ROBIN, J.; DIVANACH, P. Uses of microalgae in aquaculture. In: Stottrup, J.G., McEvoy, L. A. (Eds.), *Live Feeds in Marine Aquaculture*. Blackwell, Oxford, pp. 253–299, 2003.
- PARSONS, T. R.; STRICKLAND, J. D. H. Discussion of spectrophometric determination of marine-plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophyll-a and carotenoids. *Journal Marine Research*, 21, 105-156, 1963.
- PEDRONI, P. M.; LAMENTI, G.; PROSPERI, G.; RITORTO, L.; SCOLLA, G.; CAPUANO, F.; VALDISERRI, M. 2004. Enitecnologie R & D project on microalgae biofixation of CO₂: outdoor comparative tests of biomass productivity using flue gas CO₂ from a NGCC power plant. Proceedings of Seventh International Conference on Greenhouse Gas Control Technologies (GHGT-7), 5–9 September 2004, Vancouver, Canada.

PINTO, M. H. Produção de biossurfactantes bacteriano e fúngico por fermentação em estado sólido e submersa utilizando resíduos agroindustriais. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande-RS, 2008.

RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. *Química Nova*, 31, 7, 1609-1612, 2008.

RODOLFI, L.; CHINI ZITTELLI, G.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 1, 100-112, 2009.

RODRIGUES, L.; MOLDES, A.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus strains*. *Biochemical Engineering Journal*, 28, 109-116, 2006.

SATPUTE, S. K.; BANAT, I. M.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANPURKAR, A. G.; CHOPADE, B. A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnology Advances*, 28, 436–450, 2010.

STEWART, J. M. C. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal. Biochem.*, 104, 10, 1980.

TREDICI M. R.; RODOLFI, L. Reactor for industrial culture of photosynthetic micro-organisms. Patent WO 2004/074423 A2 to Università degli Studi di Firenze, 2004.

TREDICI, M. R.; MATERASSI, R. From open ponds to vertical alveolar panels: the Italian experience in the development of reactors for the mass cultivation of phototrophic microorganisms. *J. Appl. Phycol.* 4, 221–231, 1992.

TREDICI, M. R. Photobiology of microalgae mass culture. *Biofuels*, 1 (1), 143-162, 2010.

TULOEVA, B. K.; IVANOV, G. R.; CHRISTOVA, N. E. Biosurfactant production by new *Pseudomonas putida* strain. *Z. Naturforsch*, 57c, 356-360, 2002.

VEENANADIG, N. K.; GOLTHAMAN, M. K.; KARANTH, N. G. K. Scale up Studies for the production of biosurfactant in packed column bioreactor. *Bioprocess Engineering*. 22, 95-99, 2000.

VOLKERING, F.; BREURE, A.M.; RULKENS, W.H. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation*, 8, 401-417, 1998.

CAPÍTULO V - CONCLUSÃO GERAL

5 CONCLUSÃO GERAL

O cultivo mixotrófico de *Spirulina* sp. LEB-18 com adição noturna de fonte orgânica de carbono apresentou aumento de 2,6 vezes a concentração final de biomassa comparado ao cultivo autotrófico. Melhores respostas cinéticas de crescimento foram encontradas quando a microalga foi cultivada com 5 g.L⁻¹. Comportamento semelhante foi observado para as microalgas *S. nidulans* LEB-25, *C. vulgaris* LEB-106, *C. minutissima* LEB-108 e *C. homosphaera*.

Quanto à estimativa de produção de biossurfactantes pelas microalgas *Spirulina* sp. LEB-18, *S. nidulans* LEB-25, *C. vulgaris* LEB-106, *C. minutissima* LEB-108 e *C. homosphaera*, a redução da tensão superficial dos meios foi de 70 para 43 mN.m⁻¹, indicando a produção de biossurfactantes. Os resultados demonstram o potencial da fonte orgânica de carbono como forma de estimular o crescimento e a produção de biossurfactantes, além do potencial da utilização de melação como substrato orgânico no cultivo de microalgas, possibilitando a exploração de um subproduto de baixo custo.

Na seleção de microalgas para produção de biossurfactantes, as melhores respostas de atividade emulsificante óleo/água para as microalgas *Tetraselmis suecica* OR, *Scenedesmus* sp. 3PAV3 e *Chlorella* sp. PROD1 foram obtidas para os extratos utilizando metanol e etanol como solvente extrator. A microalga *Scenedesmus* sp. 3PAV3 apresentou valor de AE o/a superior (339,8 UE.g⁻¹). Os mínimos valores de tensões superficiais variaram de 27,4 a 31,2 mN.m⁻¹ para as microalgas estudadas. Os resultados mostraram a potencialidade da microalga *Scenedesmus* sp. 3PAV3, na produção de biossurfactantes, tanto pela redução da tensão superficial e elevados valores de atividade emulsificante, quanto pela sua capacidade de atuação como estabilizante de emulsões.

Quanto à produção de biossurfactantes por microalgas em diferentes fotobiorreatores, a microalga *Chlorella* sp. PROD1 cultivada em *Green Wall Panel*, apresentou valor de AE o/a (258,2 UE.g⁻¹) semelhante ao encontrado para o emulsificante comercial lecitina de soja (257 UE.g⁻¹), quando foi utilizada água como extrator. *Scenedesmus* sp. 3PAV3 e *Chlorella* sp. PROD1 alcançaram valores de tensões superficiais abaixo de 30 m.N.m⁻¹.

No cultivo *outdoor* da microalga marinha *Tetraselmis suecica* OR para produção de biossurfactantes, a produtividade alcançada foi de 0,37 g.L⁻¹.d⁻¹ para ambas culturas controle e com limitação de nitrogênio. Maiores valores de AE o/a foram encontrados quando a extração do biossurfactantes foi realizada com etanol e água. Menores valores de tensões superficiais foram obtidos para cultura com limitação de nitrogênio. Com este trabalho foi possível verificar

que a microalga marinha *T. suecica* OR apresentou potencial em produzir biossurfactantes, tanto pela baixa tensão superficial e elevados valores de atividade emulsificante, quanto sua capacidade de atuação como estabilizante de emulsões.

6 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

- Analisar o tipo de biossurfactante produzido pelas microalgas;
- Estudar o processo de purificação dos biossurfactantes produzidos pelas microalgas;
- Otimizar a produção de biossurfactantes pelas microalgas estudadas neste trabalho;
- Estudar o aumento de escala dos cultivos das microalgas para produção de biossurfactantes;
- Avaliar o potencial de aplicação como emulsificantes, estabilizantes, compostos antimicrobianos e na biorremediação de ambientes contaminados.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Curvas dos biossurfactantes sintéticos utilizados como padrões

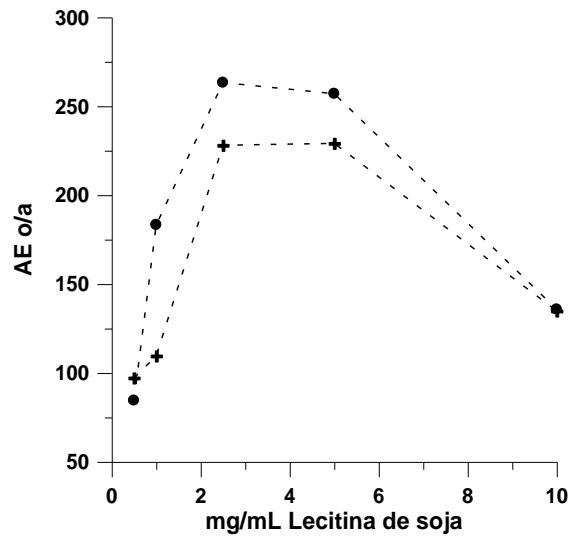


Figura 1 Curva de lecitina de soja ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) para atividade emulsificante óleo/água. (●) análise realizada com óleo de soja; (+) análise realizada com óleo de girassol.

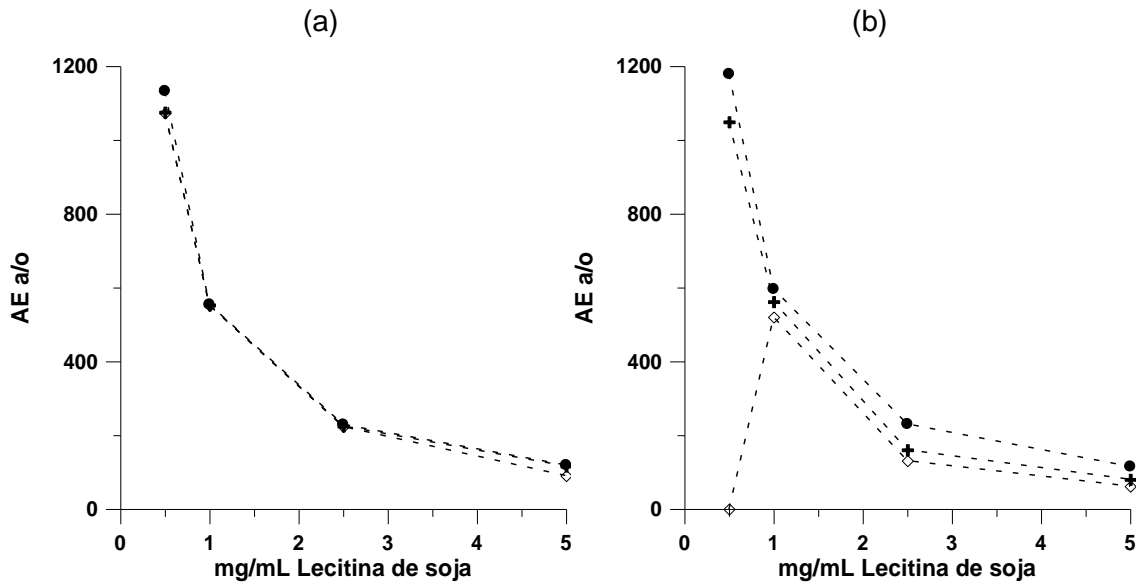


Figura 2 Curva de lecitina de soja ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) para atividade emulsificante água/óleo. (a) análise realizada com óleo de soja; (b) análise realizada com óleo de girassol: (●) 24 h; (+) 48 h; (◇) 72 h de análise.

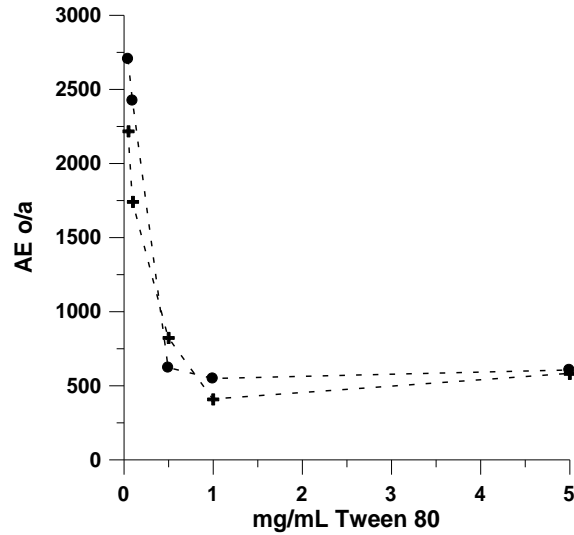


Figura 3 Curva de Tween 80 ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) para atividade emulsificante óleo/água. (●) análise realizada com óleo de soja; (+) análise realizada com óleo de girassol.

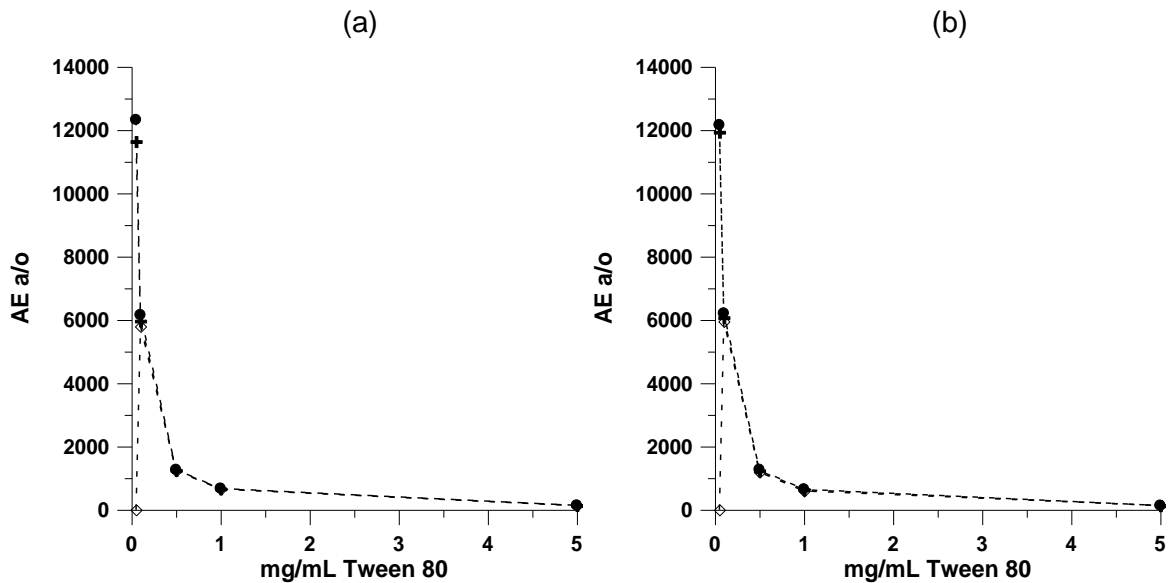


Figura 4 Curva de Tween 80 ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) para atividade emulsificante água/óleo. (a) análise realizada com óleo de soja; (b) análise realizada com óleo de girassol: (●) 24 h; (+) 48 h; (◇) 72 h de análise.

APÊNDICE 2 - Caracterização química das biomassas microalgais e dos extratos

Tabela 1 Caracterização química das biomassas microalgais quanto ao teor (%) de proteínas (prot), carboidratos (carb), lipídios (lip), fosfolipídios (fosf), clorofila a (clor a), clorofila b (clo b) e carotenóides (carot)

Cultivos	Prot	Carb	Lip	Fosf	Clor a	Clor b	Carot
<i>Nannochloropsis</i>	41,5	14,1	28,3	40,6	20,5	-	4,8
<i>Tetraselmis</i> GWP 90	32,9	22,0	21,3	18,2	18,5	9,1	5,3
<i>Tetraselmis</i> GWP controle	51,7	9,9	25,1	24,5	18,3	7,6	5,4
<i>Tetraselmis</i> GWP -N	10,9	52,4	22,1	7,1	3,6	1,7	1,9
<i>Scenedesmus</i> AC	37,7	22,5	25,5	47,0	42,0	10,7	9,4
<i>Scenedesmus</i> GWP	44,5	22,8	19,8	43,4	15,5	4,1	4,2
<i>Scenedesmus</i> Raceway	39,1	25,6	20,1	45,9	12,6	3,5	3,5
<i>Chlorella</i> AC controle	36,8	29,9	24,0	10,7	9,6	3,2	3,0
<i>Chlorella</i> AC -N	24,5	22,6	39,0	4,0	2,0	0,6	0,7
<i>Chlorella</i> GWP	43,4	23,3	19,3	26,6	17,7	4,4	4,0

Tabela 2 Caracterização química dos extratos de *Nannochloropsis* sp. FM – M24 quanto ao teor (%) de proteínas (prot), carboidratos (carb), lipídios (lip), fosfolipídios (fosf), clorofila a (clor a) e carotenóides (carot)

Extratos			Prot	Carb	Lip	Fosf	Clor a	Carot
I	Água	50°C	19,4	21,4	16,5	9,2	7,0	3,0
		90°C	19,3	19,9	21,0	10,3	7,2	3,1
		amb	12,5	16,3	66,4	46,5	48,1	20,6
II	CHCl ₃ :MeOH	50°C	7,5	9,3	32,4	22,1	25,8	11,1
		90°C	10,9	13,2	45,5	39,5	30,1	12,9
III	CHCl ₃ :MeOH	amb	9,1	14,6	33,7	37,9	18,8	8,1
IV	Sequencial	H ₂ O	35,4	31,7	30,3	22,7	26,4	11,3
		EtOH	9,0	5,3	41,4	23,2	46,3	19,8
		EtAc	0,4	0,2	1,8	0,1	0,8	0,3
		CHCl ₃	0,2	0,3	1,8	0,5	0,1	0,0
V	Sequencial	CHCl ₃	5,9	6,6	25,5	27,6	23,9	10,2
		Acetona	0,8	3,1	4,9	2,7	1,6	0,7
		MeOH	4,2	11,5	17,2	18,9	12,8	5,5
		H ₂ O	2,4	16,8	1,0	0,3	0,3	0,1
VI		EtOH	14,2	15,1	51,3	43,2	40,8	17,5
VII		MeOH	11,5	12,5	37,9	27,6	26,2	11,2
VIII		CHCl ₃	7,0	6,9	18,6	14,8	21,9	9,4
IX		H ₂ O	35,0	44,0	13,8	15,4	9,3	4,0

Amb: temperatura ambiente; EtOH: etanol; MeOH: metanol; EtAc: etil acetato

Tabela 3 Caracterização química dos extratos de *Tetraselmis suecica* OR quanto ao teor (%) de proteínas (prot), carboidratos (carb), lipídios (lip), fosfolipídios (fosf), clorofila a (clor a), clorofila b (clor b) e carotenóides (carot)

Extratos			Prot	Carb	Lip	Fosf	Clor a	Clor b	Carot
I	Água	50°C	33,8	68,2	17,1	10,9	17,0	3,4	6,0
		90°C	18,8	68,1	6,1	4,7	11,2	2,3	4,0
		amb	7,3	5,5	16,4	15,5	17,0	3,4	6,0
II	CHCl ₃ :MeOH	50°C	8,9	6,3	20,2	19,3	18,4	3,7	6,5
		90°C	8,1	6,6	17,6	18,9	15,7	3,2	5,5
III	CHCl ₃ :MeOH	amb	6,0	9,7	15,5	12,5	13,3	2,7	4,7
IV	Sequencial	H ₂ O	66,9	72,3	32,2	26,5	35,7	7,2	12,6
		EtOH	3,2	1,7	6,8	6,6	11,5	2,3	4,0
		EtAc	0,1	0,0	1,0	0,2	0,4	0,1	0,2
		CHCl ₃	0,0	0,0	2,2	0,1	0,0	0,0	0,0
V	Sequencial	CHCl ₃	6,3	3,9	17,7	4,8	7,2	1,4	2,5
		Acetona	0,0	1,6	0,4	0,4	0,2	0,0	0,1
		MeOH	0,3	1,6	2,5	0,7	1,1	0,2	0,4
		H ₂ O	2,8	7,9	5,8	1,0	0,0	0,0	0,0
VI		EtOH	10,2	7,2	34,8	16,3	23,0	4,6	8,1
VII		MeOH	9,6	5,5	23,6	13,9	18,5	3,7	6,5
VIII		CHCl ₃	6,5	3,0	22,4	8,3	15,1	3,1	5,3
IX		H ₂ O	55,5	29,7	21,9	13,6	13,1	2,6	4,6

Amb: temperatura ambiente; EtOH: etanol; MeOH: metanol; EtAc: etil acetato

Tabela 4 Caracterização química dos extratos de *Scenedesmus* sp. 3PAV3 quanto ao teor (%) de proteínas (prot), carboidratos (carb), lipídios (lip), fosfolipídios (fosf), clorofila a (clor a), clorofila b (clor b) e carotenóides (carot)

Extratos			Prot	Carb	Lip	Fosf	Clor a	Clor b	Carot
IV	Sequencial	H ₂ O	43,5	65,0	10,4	8,3	14,0	7,4	6,3
		EtOH	1,7	0,5	3,2	1,2	1,1	0,8	0,5
		EtAc	0,5	0,1	1,2	0,4	0,9	0,4	0,4
		CHCl ₃	0,1	0,0	1,3	0,0	0,1	0,1	0,0
V	Sequencial	CHCl ₃	1,5	0,7	5,8	1,5	1,7	0,5	0,8
		Acetona	1,7	1,9	5,3	1,7	1,5	0,6	0,7
		MeOH	4,6	6,0	9,0	5,2	3,1	0,8	1,4
		H ₂ O	6,6	6,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
VI		EtOH	18,5	31,4	39,8	34,7	14,3	8,7	6,4
VII		MeOH	30,1	44,6	44,1	44,2	19,0	16,7	8,5
VIII		CHCl ₃	4,9	5,1	3,8	1,0	0,7	0,6	0,3
IX		H ₂ O	45,9	85,0	29,1	15,5	8,4	7,3	3,8

Amb: temperatura ambiente; EtOH: etanol; MeOH: metanol; EtAc: etil acetato

Tabela 5 Caracterização química dos extratos de *Chlorella* sp. PROD1 quanto ao teor (%) de proteínas (prot), carboidratos (carb), lipídios (lip), fosfolipídios (fosf), clorofila a (clor a), clorofila b (clor b) e carotenóides (carot)

Extratos			Prot	Carb	Lip	Fosf	Clor a	Clor b	Carot
IV	Sequencial	H ₂ O	38,6	68,4	28,9	31,8	20,3	29,2	6,6
		EtOH	6,5	4,1	48,7	44,1	25,7	41,0	8,3
		EtAc	0,2	0,0	1,8	0,4	0,6	0,9	0,2
		CHCl ₃	0,1	0,3	3,9	0,2	0,0	0,1	0,0
V	Sequencial	CHCl ₃	3,7	1,4	22,9	15,2	12,6	12,4	4,1
		Acetona	0,5	1,5	1,9	1,6	0,9	0,6	0,3
		MeOH	2,0	8,0	6,1	12,1	5,3	6,4	1,7
		H ₂ O	24,1	19,4	1,1	0,7	0,6	1,5	0,2
VI		EtOH	4,0	1,7	30,7	27,1	22,7	14,2	7,3
VII		MeOH	2,3	0,4	22,2	23,7	9,4	5,3	3,0
VIII		CHCl ₃	2,3	0,3	18,3	14,3	13,2	6,9	4,3
IX		H ₂ O	72,2	52,6	97,5	66,2	16,8	75,1	5,4

Amb: temperatura ambiente; EtOH: etanol; MeOH: metanol; EtAc: etil acetato

APÊNDICE 3 - Estudo da extração de biossurfactantes das microalgas



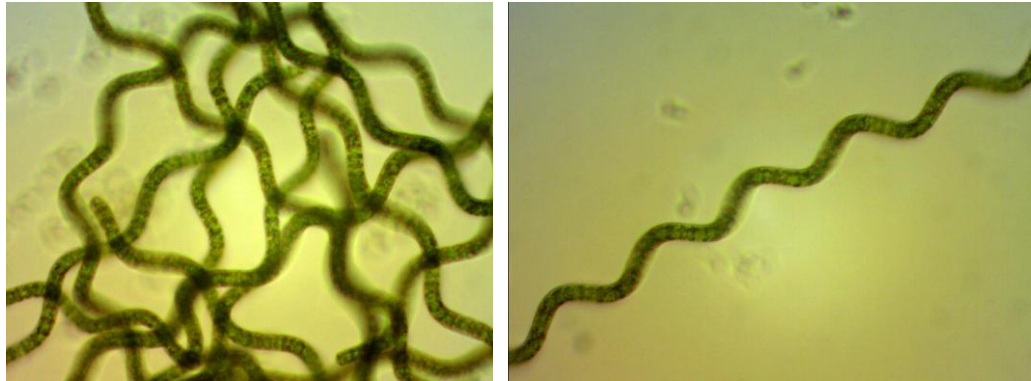
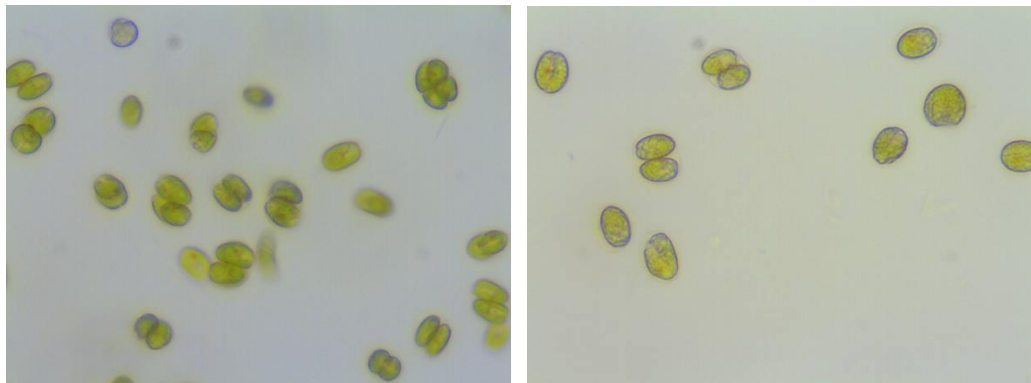
Figura 1 Rompimento celular em sonda ultrassônica



Figura 2 Extração seqüencial de biossurfactantes das microalgas

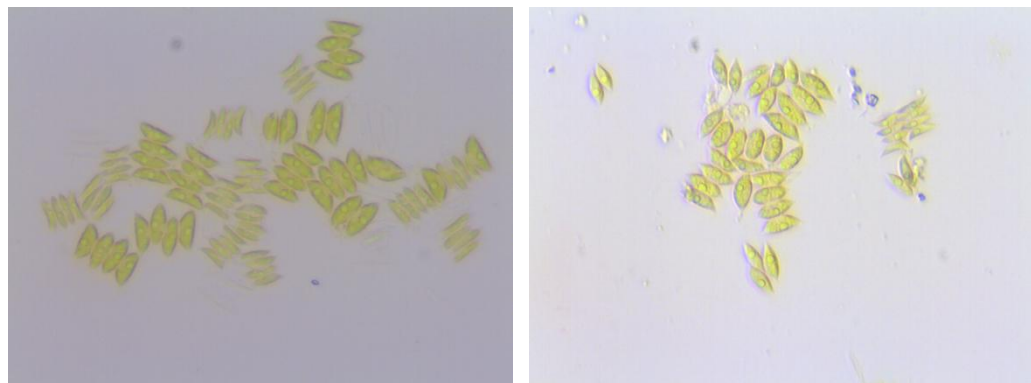


Figura 3 Extrato de biossurfactantes das microalgas

APÊNDICE 4 – Fotos das células das microalgasFigura 1 Células de *Spirulina* sp. LEB-18

(a)

(b)

Figura 2 Células de *Tetraselmis suecica* OR: (a) cultura controle; (b) cultura com limitação de NFigura 3 Células de *Scenedesmus* sp. 3PAV3

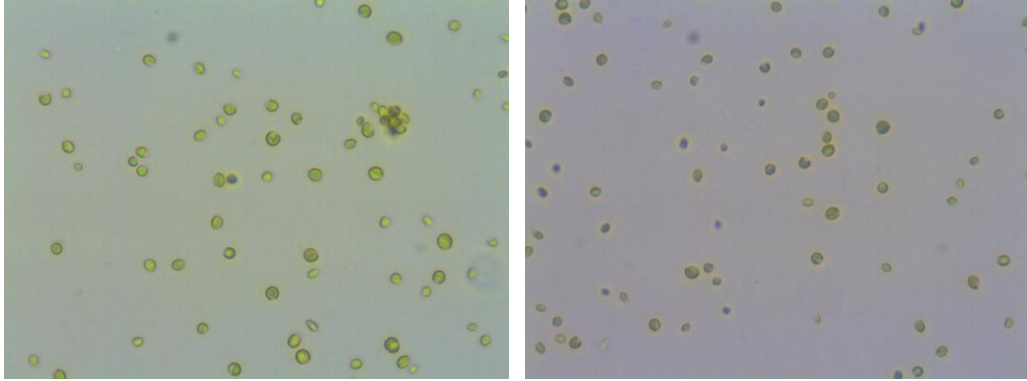


Figura 4 Células de *Chlorella* sp. PROD1

ANEXOS

ANEXO 5 – Meio Zarrouk

Tabela 1 Composição do Meio Zarrouk

Reagentes	Quantidade (g.L ⁻¹)
NaHCO ₃	16,8
K ₂ HPO ₄	0,50
NaNO ₃	2,50
K ₂ SO ₄	1,00
NaCl	1,00
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,20
CaCl ₂	0,04
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,01
EDTA	0,08
Solução A5	1 mL
Solução B6	1 mL

FONTE: ZARROUK, 1966.

Solução A5: (g.L⁻¹): H₃BO₃, 2,86; MnCl₂.4H₂O, 1,81; ZnSO₄.7H₂O, 0,222; Na₂MoO₄.2H₂O, 0,390; CuSO₂.5H₂O, 0,079.

Solução B6: (mg.L⁻¹): NH₄VO₃: 22,86; KCr(SO₄)₂. 12 H₂O: 192; NiSO₄. 6H₂O: 44,8; Na₂WO₄. 2H₂O: 17,94; TiOSO₄. 8H₂O: 61,1; CO(NO₃)₂. 6H₂O: 43,98.

ANEXO 2 – Meio BG-11

Tabela 2 Composição do meio BG-11

Reagente	g.L ⁻¹
NaNO ₃	1,5
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,04
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,036
Ácido cítrico	0,006
Citrato férrico amoniacal	0,006
EDTA	0,001
Na ₂ CO ₃	0,02
Micronutrientes (A5 + Co)*	1mL.L ⁻¹

FONTE: RIPPKA, 1979

* Micronutrientes (A5 + Co) (mg.L⁻¹): H₃BO₃, 2,86; MnCl₂.4H₂O, 1,81; ZnSO₄.7H₂O, 0,222; Na₂MoO₄.2H₂O, 0,390; CuSO₂.5H₂O, 0,079; Co(NO₃)₂.6H₂O, 0,0494.

ANEXO 3 – Meio F

Reagentes	Dose por 1 L
NaNO ₃	150 mg
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	10 mg
FeCl ₃ . 6 H ₂ O	6,3 mg (1,3 mg Fe)
Na ₂ EDTA	8,72 mg
Na ₂ SiO ₃ . 9H ₂ O	30 – 60 (3 – 6 mg Si)
Vitaminas	
Tiamina – HCl	0,2 mg
Biotina	1,0 µg
B12	1,0 µg
Microelementos	
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,0196 mg (0,005 mg Cu)
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,044 mg (0,01 mg Zn)
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,020 mg (0,0005 mg Co)
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	0,360 mg (0,1 mg Mn)
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,0126 mg (0,005 mg Mo)
H₂O do mar	! L (salinidade = 30 g.L⁻¹)

FONTE: GUILLARD e RYTHER, 1962.

