

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
ESCOLA DE QUÍMICA

**Júlia Frauches do Nascimento**



AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO SEMI-CONTÍNUA DE  
RAMNOLIPÍDEOS E RECUPERAÇÃO POR SISTEMA  
DE ULTRAFILTRAÇÃO

RIO DE JANEIRO

2023

Júlia Frauches do Nascimento

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO SEMI-CONTÍNUA DE RAMNOLIPÍDEOS E  
RECUPERAÇÃO POR SISTEMA DE ULTRAFILTRAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

Orientador(es): D.Sc. Frederico de Araujo Kronemberger  
M.Sc. Marcos Vinicius Giro Maitam

Rio de Janeiro

2023

D631a DO NASCIMENTO, JÚLIA FRAUCHES  
AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO SEMI-CONTÍNUA DE  
RAMNOLIPÍDEOS E RECUPERAÇÃO POR SISTEMA DE  
ULTRAFILTRAÇÃO / JÚLIA FRAUCHES DO NASCIMENTO. --  
Rio de Janeiro, 2023.  
76 f.

Orientador: D.Sc. Frederico de Araujo  
Kronemberger.

Coorientador: M.Sc. Marcos Vinicius  
Giro Maitam .

Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de  
Química, Bacharel em Engenharia de Bioprocessos,  
2023.

1. Ramnolipídeos. 2. Ultrafiltração. 3. Batelada  
Alimentada. I. de Araujo Kronemberger, D.Sc.  
Frederico , orient. II. Giro Maitam , M.Sc.  
Marcos Vinicius , coorient.  
III. Título.

Júlia Frauches do Nascimento

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO SEMI-CONTÍNUA DE RAMNOLIPÍDEOS E  
RECUPERAÇÃO POR SISTEMA DE ULTRAFILTRAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Escola de Química da Universidade Federal do Rio  
de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à  
obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

Aprovado em 19 de dezembro de 2023.

---

Frederico de Araujo Kronemberger, D.Sc., COPPE - UFRJ

---

Marcos Vinicius Giro Maitam, M.Sc., COPPE - UFRJ

---

Priscilla Filomena Fonseca Amaral Secca, D.Sc., EQ - UFRJ

---

Helen Conceição Ferraz, D.Sc., COPPE-UFRJ

Rio de Janeiro  
2023

*Dedico este trabalho para João, Alice, Keila e Benjamin. Sem vocês, família, nada disso seria possível, amo vocês.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por tantas bênçãos concedidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a minha família por, mesmo sabendo tão pouco sobre o mundo dos bioprocessos, sempre demonstrar entusiasmo por minha pesquisa.

Agradeço a você João, por não me deixar desistir.

Agradeço aos meus orientadores, Professor Fred que me tranquilizava quando tudo parecia dar errado e me dizia que fazer ciência era assim mesmo, descobrir como não fazer uma coisa várias vezes, até descobrir como fazer, e Marcos que esteve comigo no dia a dia do laboratório, sem a sua ajuda esse trabalho não seria possível.

Também agradeço a todo o corpo técnico do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (Labim – IQ/UFRJ) e do Laboratório de Processos de Separação com Membranas e Polímeros (PAM – COPPE/UFRJ) por cederem espaço para o desenvolvimento de minha pesquisa, em especial aos técnicos Francisco e Douglas do Labim, obrigada por sempre estarem disponíveis para me ajudar.

Por fim, gostaria de agradecer, ao Programa de Recursos Humanos da ANP nº 3.1 - PRH-UFRJ, por me propiciar uma formação complementar em Processos e Sistemas da Indústria de Petróleo e de Biocombustíveis na área de Biotecnologia e Energias Renováveis.

Este trabalho foi desenvolvido contando com apoio financeiro da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP, e da Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP, por meio do Programa de Recursos Humanos da ANP para o Setor de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Agradeço também à Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ pela formação ofertada no curso de graduação e apoio ao programa.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcutá)*

## RESUMO

DO NASCIMENTO, Júlia Frauches. **Avaliação da Produção Semi-Contínua de Ramnolipídeos e Recuperação por Sistema de Ultrafiltração**. Rio de Janeiro, 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

O objetivo principal desse projeto foi o de estudar a produção em batelada alimentada sob limitação de nitrogênio de biossurfactantes do tipo ramnolipídeo, a partir de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. A viabilidade da recuperação deste bioproduto utilizando um sistema de ultrafiltração também foi alvo de investigação. Testes foram conduzidos em frascos agitados com meio de cultivo adequado contendo uma cepa bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* previamente selecionada de ambientes de petróleo como inóculo para a produção de biossurfactantes. A recuperação do produto em solução, isento de células e de demais materiais em suspensão, foi realizada através de um sistema de ultrafiltração composto por um aparelho de bombeamento e um módulo de membranas poliméricas submersas. Os resultados indicaram a viabilidade do procedimento de batelada alimentada realizado, sendo possível a obtenção de até 5,3 g L<sup>-1</sup> de ramnolipídeos, com produtividade volumétrica de 18,3 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> com reposição de carbono e nitrogênio após 220h de fermentação. A recuperação do biossurfactante por ultrafiltração também foi viável, com eficiência de recuperação superior a 90% para membranas novas e >50% para membranas reutilizadas. Dessa forma, conclui-se que a implementação do acoplamento de membranas de ultrafiltração (UF) para a remoção submersa do produto purificado, aliado à adoção de estratégias de alimentação suplementar, configura uma abordagem viável para ampliar a produtividade operacional na produção de ramnolipídeos.

Palavras-chave: Ramnolipídeos. Ultrafiltração. Batelada Alimentada

## ABSTRACT

DO NASCIMENTO, Júlia Frauches. **Avaliação da Produção Semi-Contínua de Rhamnolípídeos e Recuperação por Sistema de Ultrafiltração**. Rio de Janeiro, 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

The main objective of this project was to study fed-batch production under nitrogen limitation of rhamnolipid biosurfactants, produced from a *Pseudomonas aeruginosa* strain, and the feasibility of recovering the bioproduct using a ultrafiltration system. The procedure was carried out in shake flasks with 500mL of a fermentative medium containing a bacterial strain of *Pseudomonas aeruginosa* previously selected from petroleum environments as an inoculum for biosurfactant production. The recovery of the product in solution, free of cells and other suspended materials, was performed through a ultrafiltration system composed of a pumping apparatus and a submerged module with polymeric membranes. The results indicated the viability of the fed-batch procedure, with the attainment of up to 5.3 g L<sup>-1</sup> of rhamnolipids and a volumetric productivity of 18.3 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> with carbon and nitrogen replenishment after 220 hours of fermentation. The recovery of the biosurfactant by ultrafiltration was also feasible, achieving a recovery efficiency greater than 90% for new membranes and >50% for reconditioned ones. Thus, it can be concluded that the implementation of the ultrafiltration (UF) membrane coupling for submerged removal of the purified product, combined with the adoption of supplementary feeding strategies, constitutes a viable approach to enhance operational productivity in the production of rhamnolipids.

Keywords: Rhamnolipid. Ultrafiltration. Fed-Batch

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
2. Objetivo.....	17
3. Revisão Bibliográfica.....	17
3.1.    Biossurfactantes.....	17
3.1.1.    Propriedades dos Biossurfactantes .....	21
3.1.2.    Aplicações dos Biossurfactantes .....	24
3.1.2.1.    Aplicação na indústria de alimentos.....	24
3.1.2.2.    Aplicação dos biossurfactantes na área da saúde .....	25
3.1.2.3.    Aplicação no Meio Ambiente.....	25
3.1.2.4.    Aplicação na indústria de Óleo e Gás.....	26
3.2.    Ramnolipídeos.....	28
3.2.1.    Fatores que influenciam a produção de Ramnolipídeos.....	30
3.2.1.1.    Fonte de carbono .....	30
3.2.1.2.    Nitrogênio e Parâmetros Operacionais.....	32
3.2.1.3.    Estratégias Fermentativas.....	33
3.3.    Recuperação e Purificação.....	35
3.3.1.    Processos de Separação por membrana.....	37
4. Metodologia .....	40
4.1.    Cultivos.....	40
4.1.1.    Microrganismo .....	40
4.1.2.    Pré-Inóculo .....	40
4.1.3.    Cultivo em Frascos .....	40
4.2.    Métodos Analíticos de Quantificação .....	41
4.2.1.    Biomassa.....	41
4.2.2.    Glicerol e Ramnolipídeos .....	41
4.3.    Sistema de Ultrafiltração e Procedimento Experimental.....	42
4.3.1.    Módulo de Ultrafiltração .....	42
4.3.1.    Ultrafiltração.....	43
4.3.2.    Limpeza .....	44
4.3.3.    Planejamento Experimental.....	44
5. Resultados .....	45
<b>Avaliação da produção de ramnolipídeos em limitação de nitrogênio .....</b>	<b>46</b>
<b>Avaliação da Ultrafiltração para recuperação de ramnolipídeos .....</b>	<b>61</b>

6. Conclusão .....	66
7. Referências .....	68

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Organização e estrutura de surfactantes. A) Formação de Micelas em meio polar; B) Formação de Micelas em meio apolar. Fonte: Qnesc, 2017.....	18
Figura 2: Exemplos de Biossurfactantes. a) Mono-ramnolipídeo (Glicolipídeo); b) Di-ramnolipídeo (Glicolipídeo); c) Surfactina (Lipopeptídeo); d) Trehalolipídeo (Glicolipídeo); e) Emulsan (Surfactante Polimérico).....	19
Figura 3. Tabela de tipos de biossurfactante por microrganismo produtor. Fonte: Marinho et al., 2022 .....	20
Figura 4. Esquematização da formação de micelas em meio oleoso e aquoso. Fonte: Daltin, 2012 .....	22
Figura 5. Técnicas de Revitalização de Campos. Fonte: CBIE, 2019.....	27
Figura 6. Estrutura dos Ramnolipídeos. a) Mono-ramnolipídeo; b) Di-ramnolipídeo.....	29
Figura 7. Partículas e moléculas retidas de acordo com o tipo de PSM. Fonte: Galvão e Gomes (2015) .....	38
Figura 8. Aspecto das membranas .....	42
Figura 9. Módulo de Ultrafiltração. Elaboração própria .....	43
Figura 10. Experimento 1 - Gráfico de crescimento de Biomassa e Consumo de Glicerol para o frasco controle. ....	46
Figura 11. Experimento 1 - Gráfico de crescimento de Biomassa e Consumo de Glicerol para o frasco ultrafiltrado. ....	47
Figura 12. Formação de espuma nos frascos agitados devido a presença do módulo de ultrafiltração.....	48
Figura 13. Experimento 1 – Comparação da produção de ramnolipídeos dos frasco controle e ultrafiltrado. ....	48
Figura 14. Experimento 2 - Gráfico de crescimento de Biomassa e Consumo de Glicerol para o frasco controle .....	50
Figura 15 Experimento 2 - Gráfico de crescimento de Biomassa e Consumo de Glicerol para o frasco ultrafiltrado. ....	51
Figura 16. Experimento 2 – Comparação da produção de ramnolipídeos dos frasco controle e ultrafiltrado .....	52
Figura 17. Experimento 3 - Gráfico de crescimento de Biomassa e Consumo de Glicerol para o frasco controle .....	54
Figura 18. Experimento 3 - Gráfico de crescimento de Biomassa e Consumo de Glicerol para o frasco ultrafiltrado. ....	55
Figura 19. Experimento 3 – Comparação da produção de ramnolipídeos dos frasco controle e ultrafiltrado .....	56
Figura 20. Experimento 4 - Gráfico de crescimento de Biomassa e Consumo de Glicerol para o frasco controle .....	58
Figura 21. Experimento 4 - Gráfico de crescimento de Biomassa e Consumo de Glicerol para o frasco ultrafiltrado. ....	58
Figura 22. Experimento 4 – Comparação da produção de ramnolipídeos dos frasco controle e ultrafiltrado .....	59

Figura 23. A) Frascos agitados antes da reposição de nitrogênio. B) Frascos agitados após reposição de nitrogênio.....	60
Figura 24. Permeado recolhido na ultrafiltração .....	62
Figura 25. Comparação entre eficiência de recuperação entre módulos novos e reutilizados. ....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resíduos utilizados para produção de Ramnolipídeos. Compilado por este autor ...	32
Tabela 2. Características dos PSM. Adaptado de Galvão e Gomes (2015) .....	37
Tabela 3. Especificações da Membrana (Tabela do Fabricante) .....	42
Tabela 4. Resumo do planejamento experimental .....	45
Tabela 5. Experimento 1 – Resultados de produtividade volumétrica e $Y_p/s$ .....	50
Tabela 6. Experimento 2 – Resultados de produtividade volumétrica e $Y_p/s$ .....	53
Tabela 7. Experimento 3 – Resultados de produtividade volumétrica e $Y_p/s$ .....	57
Tabela 8. Experimento 4 – Resultados de produtividade volumétrica e $Y_p/s$ .....	59
Tabela 9. Resumo dos parâmetros de fermentação de todos os experimentos ao final da fermentação. ....	60
Tabela 10. Dados de Ultrafiltração.....	65

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CMC - Concentração Micelar Crítica

FES - Fermentação em estado sólido

FS - Fermentação Submersa

UF - Ultrafiltração

Pp - Produtividade

PSM - Processos de Separação por Membrana

RML - Ramnolipídeos

Yp/s - Fator de conversão de substrato em produto

# 1. Introdução

A exploração e o processamento de recursos naturais desempenham um papel central no desenvolvimento industrial. Contudo, à medida que as atividades industriais se expandem globalmente, os problemas ambientais associados tornam-se cada vez mais evidentes e preocupantes (Jimoh e Lin, 2019).

Devido ao grande potencial energético e à diversidade de aplicações dos seus derivados, o petróleo é hoje a principal fonte de energia utilizada no mundo. No entanto, a exploração deste recurso também está atrelada a uma série de potenciais impactos ao meio ambiente. Os derramamentos de óleo, resultantes de acidentes durante a exploração, produção, transporte ou manuseio inadequado desse recurso, representam uma ameaça à biodiversidade e comprometem a subsistência de comunidades costeiras e os setores econômicos dependentes de ecossistemas marinhos saudáveis (Jimoh & Lin, 2019).

A degradação do petróleo em áreas contaminadas é um processo complexo que envolve a ação de diversos microrganismos, condições ambientais favoráveis e, em alguns casos, a implementação de tecnologias específicas. A capacidade de microrganismos degradadores de petróleo em metabolizar os hidrocarbonetos presentes no petróleo é fundamental para esse processo natural de remediação (Christofi & Ivshina, 2016).

Os surfactantes biológicos ou biossurfactantes, são agentes tensoativos produzidos por células vivas, majoritariamente microrganismos (Marchant & Banat, 2012). Estes compostos possuem diversas vantagens sob os surfactantes sintéticos pois tem menor potencial poluidor ao meio ambiente, são menos tóxicos e possuem maior biodegradabilidade (Marchant & Banat, 2012; Long *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2016). Além disso, os biossurfactantes possuem valores inferiores de concentração micelar crítica quando comparados aos surfactantes sintéticos, implicando em uma melhor eficiência (Jahan, 2019).

Os biossurfactantes desempenham um papel crucial na remediação de áreas contaminadas por petróleo visto que têm a capacidade de alterar as propriedades de superfície dos contaminantes, facilitando sua dispersão, emulsificação e tornando os hidrocarbonetos mais

acessíveis para a degradação por microrganismos. Essa melhoria na disponibilidade para os microrganismos resulta em uma estimulação significativa da atividade microbiana em áreas contaminadas, promovendo a proliferação de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos e acelerando a taxa de degradação biológica (Zhang *et al.*, 2016).

Os ramnolipídeos têm o melhor potencial biossurfactante já conhecido, devido as suas propriedades antibacterianas, antifúngicas, farmacêuticas e detergentes. No entanto, a produção de ramnolipídeos, embora promissora em diversas aplicações, enfrenta desafios significativos. Comparados a surfactantes sintéticos tradicionais, os ramnolipídeos podem ter um custo de produção mais elevado. Isso pode impactar a sua ampla utilização, especialmente em atividades em que os surfactantes sintéticos apresentam uma boa performance (Sarubbo *et al.*, 2022)

A otimização da produção e o desenvolvimento de sistemas de separação e purificação eficientes podem ser fundamentais para garantir a competitividade deste bioprodutos de interesse à indústria de óleo e gás. Os sistemas de separação por membranas são atraentes, pois podem ser acoplados aos sistemas de fermentação de maneira integrada possibilitando a retirada contínua de ramnolipídeos (Chen *et al.*, 2007).

Outro fator relevante para a evolução da produção desse biossurfactante para a escala industrial é a necessidade de uma cuidadosa adaptação dos processos de fermentação. Um dos principais obstáculos está relacionado à complexidade do processo de produção, que envolve microrganismos específicos, geralmente cepas de *Pseudomonas*, em condições controladas de cultivo, demandando cuidados precisos no manejo de nutrientes, pH e temperatura para otimizar a produção (Suh *et al.*, 2019)

Sodagari & Ju (2019) pontuaram que para otimizar a eficiência do processo, é vantajoso estender a produção de ramnolipídeos na fase estacionária de crescimento microbiano, pois possibilita redução nos custos de coleta do produto, tendo em vista que as concentrações de ramnolipídeos são acumuladas, o tempo de inatividade e trabalho necessário para limpeza e reabastecimento do reator é menor, além da redução do consumo de substrato e do tempo dedicado ao crescimento repetido de células. Em conjunto, esses fatores têm o potencial de aumentar tanto a produtividade quanto o rendimento de ramnolipídeos. Estudos prévios, no entanto, indicam que a produtividade dos ramnolipídeos diminui consideravelmente ou cessa completamente após um determinado período da fase estacionária. Duas são as principais

hipóteses levantadas para esta redução de produtividade em longos períodos de fase estacionária:

- 1 – Limitação de nutrientes como o nitrogênio por longos períodos reduz a produção de ramnolipídeos e,
- 2 – O acúmulo de ramnolipídeos é um inibidor da produção deste bioproduto.

Buscando compreender melhor a cinética envolvida na produção dos ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*, foi avaliada neste estudo a produção de ramnolipídeos em limitação de nitrogênio para prolongamento da fase estacionária e retirada de produto por ultrafiltração.

## 2. Objetivo

O objetivo geral deste trabalho é o de estudar a viabilidade de produção semi-contínua de biossurfactante do tipo ramnolipídeo através de uma abordagem que envolve a recuperação deste bioproduto por ultrafiltração com membranas na forma de fibras-ocas seguida de reposição de fonte de carbono e nitrogênio, configurando um processo em batelada alimentada.

Objetivos Específicos:

- Avaliar o efeito da limitação prolongada de nitrogênio na produtividade dos ramnolipídeos.
- Avaliar o efeito da retirada de produto, por ultrafiltração, na produtividade dos ramnolipídeos.

## 3. Revisão Bibliográfica

### 3.1. Biossurfactantes

A palavra surfactante é oriunda da abreviação do termo original em inglês, *surface active agents* (agentes ativos de superfície), e este nome é atribuído a uma classe de compostos capazes de atuar na interface de dois fluídos imiscíveis. (Dave e Joshi, 2017). Esses compostos apresentam características anfifílicas, ou seja, são capazes de interagir com moléculas polares ou apolares por possuírem em sua estrutura frações de caráter hidrofílico, também chamadas de cabeça polar e frações hidrofóbicas também chamadas de cauda apolar.

A fração hidrofílica interage fortemente com as moléculas de água por meio de interações dipolares ou íon-dipolo, o que possibilita a solubilização dos surfactantes em água. A fração hidrofóbica é composta por cadeias carbônicas lineares ou ramificadas, que são insolúveis em água, mas solúveis em óleos, gorduras e hidrocarbonetos. É o equilíbrio entre as partes hidrofóbicas e hidrofílicas da molécula de surfactante que proporciona a esses sistemas a propriedade de se acumularem em várias interfaces e exibirem comportamento de auto-organização e formação de micelas (Daltin, 2011).

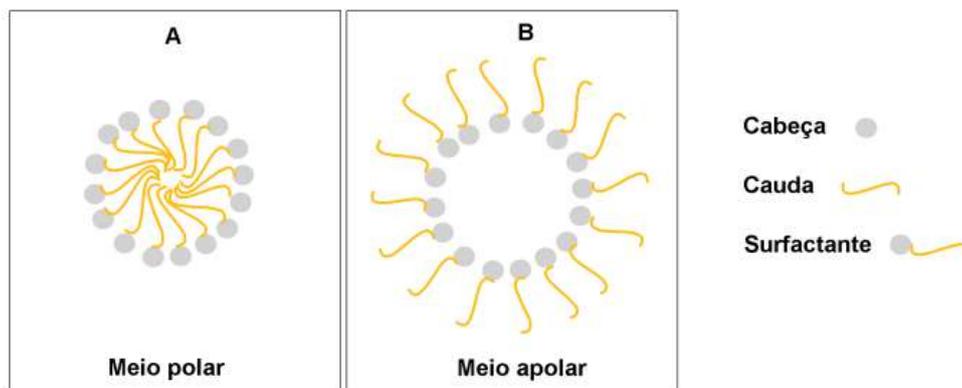


Figura 1. Organização e estrutura de surfactantes. A) Formação de Micelas em meio polar; B) Formação de Micelas em meio apolar. Fonte: Qnesc, 2017

Os surfactantes podem ser produzidos sinteticamente ou como produto do metabolismo de organismos vivos, estes recebem o nome biossurfactantes ou surfactantes biológicos (Marchant e Banat, 2012).

Os surfactantes sintéticos são em geral classificados quanto a carga de sua fração hidrofílica, podendo apresentar grupos aniônicos, catiônicos, não iônicos ou anfóteros, que se comportam como ácido ou base dependendo do pH do meio (Daltin, 2012). Os biossurfactantes possuem em geral caráter neutro, aniônico ou catiônico, no entanto não costumam ser classificados quanto ao seu grupo polar, mas principalmente quanto a origem microbiana e a composição química.

Por serem um produto do metabolismo microbiano a composição dos biossurfactantes varia de acordo com o microrganismo produtor. A fração hidrofílica pode ser composta por carboidratos, aminoácidos, peptídeos catiônicos ou aniônicos, mono- ou di- polissacarídeos, e a parte hidrofóbica composta de cadeias de hidrocarbonetos insaturados ou saturados ou ácidos graxos. Dessa forma, os biossurfactantes são classificados quanto a composição química de

suas partes polares, tais como glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas, lipídeos neutros, fosfolipídeos, ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (Santos *et al.*, 2016).

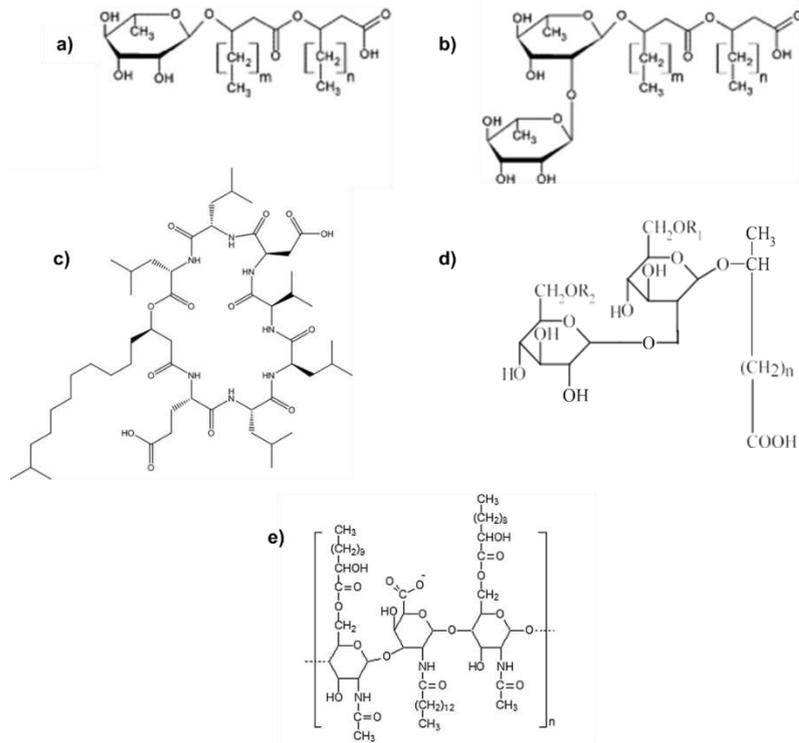


Figura 2: Exemplos de Biosurfactantes. a) Mono-ramnolipídeo (Glicolipídeo); b) Di-ramnolipídeo (Glicolipídeo); c) Surfactina (Lipopeptídeo); d) Trehalolipídeo (Glicolipídeo); e) Emulsan (Surfactante Polimérico)

Esses compostos podem ser divididos em duas classes: Baixo peso molecular - são classificados os glicolipídeos e lipopeptídeos; Alto peso molecular – são classificados os polissacarídeos, lipopolissacarídeos e proteínas ou lipoproteínas. Em geral, os biosurfactantes de baixo peso molecular são mais eficazes na redução da tensão superficial e interfacial, enquanto os de alto peso molecular são mais efetivos na estabilização de emulsões óleo em água (Banat, 2010).

Classe/Tipo de Biossurfactante	Micro-organismos
<b>Glicolipídeos</b>	
Ramnilipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídeos	<i>Candida bombicola, Candida apicola</i>
Trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis, Mycobacterium sp.</i>
<b>Lipopeptídeos e lipoproteínas</b>	
Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawettin	<i>Serratia marcescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polymyxin	<i>Bacillus polymyxa</i>
<b>Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos</b>	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
<b>Surfactantes poliméricos</b>	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Mannan-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
<b>Surfactante particulado</b>	
Vesícula	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

Figura 3. Tabela de tipos de biossurfactante por microrganismo produtor. Fonte: Marinho *et al.*, 2022

Por serem obtidos como produto do metabolismo microbiano, os biossurfactantes possuem vantagens sob os surfactantes sintéticos pois tem menor potencial poluidor ao meio ambiente, são menos tóxicos e possuem maior biodegradabilidade (Marchant & Banat, 2012; Santos *et al.*, 2016). Além disso, os biossurfactantes possuem valores inferiores de concentração crítica de micelização quando comparados aos surfactantes sintéticos, implicando em uma melhor eficiência (Jahan, 2019).

No entanto, do ponto de vista econômico, ainda são desfavorecidos competitivamente em comparação aos surfactantes sintéticos devido ao seu alto custo de produção. (Santos *et al.*, 2016). Neste sentido, algumas estratégias são propostas com o objetivo de aprimorar os processos biotecnológicos de produção de biossurfactantes (Dolman, 2019). As principais abordagens são:

1. **O desenvolvimento e uso de engenharia genética no desenvolvimento cepas recombinantes capazes de obter maior produtividade.** Tahzibi *et al.* (2004) reportaram o aumento de 10 vezes em produtividade de ramnilipídeos utilizando uma cepa mutante em

comparação a uma selvagem. Todavia, em que pese a engenharia genética possa aumentar a produção de biossurfactantes, o uso de organismos geneticamente modificados (OGM) não é favorável aos consumidores (Salek & Euston, 2019).

2. **Uso de resíduos de origem renovável como fonte de carbono nos meios de cultivo, visando baratear a produção.** Os microrganismos são capazes de produzir biossurfactantes utilizando uma variedade de substratos provenientes de fontes renováveis, tais como resíduos industriais e agrícolas, por isso e em função da crescente preocupação com o meio ambiente, estão sendo estudadas formas de redução do custo de produção dos biossurfactantes, sendo a utilização de resíduos como malte, melação, gordura animal, óleos vegetais, resíduos de petróleo, produtos lácteos e resíduos de destilarias como uma das alternativas (Jiang *et al.*, 2021; Gaur *et al.*, 2022).
3. **Inovação e otimização de processos *downstream* que tenham um custo mais baixo e que sejam eficientes para maximizar a recuperação e purificação do bioproduto.** Tendo em vista que métodos convencionais requerem grandes quantidades de solventes orgânicos que, além de aumentar o custo de produção, tem um impacto ambiental negativo, alternativas mais “limpas” e baratas são importantes para baratear o custo do produto (Jauregi & Kourmentza, 2019).

### 3.1.1. Propriedades dos Biossurfactantes

Para compreender a atuação dos surfactantes em sistemas de fases imiscíveis é necessário primeiramente compreender os fenômenos físico-químicos que ocorrem quando estas fases interagem.

As moléculas em um líquido estão constantemente em movimento e interagem entre si por meio de forças atrativas. Essas forças tendem a puxar as moléculas umas em direção às outras, resultando na formação de uma estrutura coesa. No entanto, as moléculas na superfície do líquido têm menos vizinhos semelhantes em comparação com as moléculas no interior do líquido. Devido ao desequilíbrio entre as forças que atuam nas moléculas da superfície em comparação com aquelas presentes no interior da solução, as moléculas da superfície exibem uma força atrativa mais forte sobre suas vizinhas. Esse fenômeno é chamado tensão superficial (Ulisses *et al.*, 2017).

Também pode existir uma tensão na interface entre líquidos imiscíveis, chamada de tensão interfacial. As moléculas localizadas na superfície entre as duas fases estão rodeadas por moléculas da mesma fase, mas também por moléculas vizinhas da outra fase. Essa configuração resulta em interações desiguais e conseqüentemente, o estado de energia das moléculas na superfície é maior do que o estado de energia dentro de cada fase individual. Quanto maior a tensão interfacial mais difícil a mistura dos líquidos (Lins, 2021).

Uma das propriedades importantes dos tensoativos é sua capacidade de diminuir a tensão interfacial entre as duas fases. Quando um tensoativo é adicionado a um sistema contendo água e óleo, por exemplo, as moléculas do tensoativo se acumulam na interface entre as duas fases. A parte hidrofílica do tensoativo interage com as moléculas de água, enquanto a parte hidrofóbica se orienta em direção ao óleo. Essa orientação reduz a energia da interface e permite que as duas fases imiscíveis se misturem de maneira mais eficiente (Mulligan, 2005).

À medida que interface das fases alcança a saturação em surfactante é iniciado o processo de formação de micelas. Neste processo as moléculas de surfactante se organizam em estruturas mais estáveis do que as moléculas livres no seio dos fluídos da mistura. A concentração na qual é iniciado o processo de formação de micelas é chamada de Concentração Micelar Crítica (CMC). Abaixo da CMC, as moléculas de tensoativo estão presentes na forma de monômeros dispersos (Piróllo, 2006).

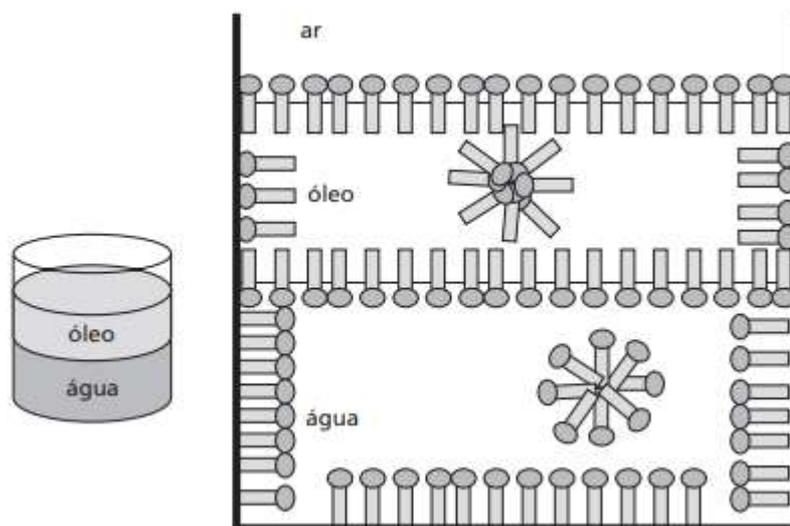


Figura 4. Esquemática da formação de micelas em meio oleoso e aquoso. Fonte: Daltin, 2012

Devido a estas características os surfactantes sintéticos e biossurfactantes compartilham várias propriedades como capacidade de formação de espuma, emulsificação, capacidade de estabilização, solubilidade e detergência. No entanto, foi demonstrado que os biossurfactantes superam ou possuem propriedades adicionais que os tornam mais atraentes do que seus equivalentes sintéticos (Sarubbo *et al.*, 2022).

Os biossurfactantes geralmente têm uma CMC mais baixa do que os surfactantes sintéticos, o que significa que eles são eficientes em concentrações menores (Jahan, 2019).

Os ramnolipídeos, são biossurfactantes do tipo glicolipídeos que são considerados os mais promissores para a aplicação industrial, os valores de CMC destes tensoativos, por exemplo, podem variar de 10 a 200 mg L<sup>-1</sup>. Dessa forma, esses compostos são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN m<sup>-1</sup> para menos de 27 mN m<sup>-1</sup> e a tensão interfacial entre da água e n-hexadecano de 40 mN m<sup>-1</sup> para valores abaixo de 1 mN m<sup>-1</sup> (Christofi & Ivshina, 2016; Mulligan, 2005).

Devido as essas características, os biossurfactantes têm sido extensivamente estudados quanto ao comportamento de emulsificação e desemulsificação. A emulsificação refere-se à dispersão de um líquido imiscível em outro, formando microgotículas. Por outro lado, a desemulsificação desestabiliza a emulsão, perturbando a camada superficial entre a fase interna e a fase externa (Daltin, 2012). Os sofrólipídeos e ramnolipídeos são conhecidos por sua forte atividade de emulsificação e capacidade de solubilizar hidrocarbonetos em água (Kashif *et al.*, 2022).

Outra propriedade que está diretamente relacionada a tensão superficial é a molhabilidade. Esta propriedade é definida como a capacidade de um fluído se aderir a uma superfície sólida, na presença de outro fluído. No caso de um sistema rocha/óleo/água a molhabilidade descreve a preferência da rocha de estar em contato com a água ou com o óleo na presença do outro fluido (Silva, 2003).

A molhabilidade de um líquido em relação a uma superfície sólida é importante tanto do ponto de vista teórico quanto em termos de aplicações práticas. Visto que esta propriedade está relacionada com aspectos como corrosão, lubrificação e aderência, que são de grande interesse em diversas indústrias (Nascimento, 2015).

Um grande desafio para a Indústria de Petróleo, por exemplo, está no fato de que algumas rochas dos reservatórios têm, molhabilidade favorável a óleo, ou seja, possuem maior afinidade com as moléculas de óleo do que as moléculas de água o que dificulta o processo de recuperação. Os biossurfactantes são capazes de inverter a molhabilidade do reservatório, deixando as rochas molháveis à água e facilitando o fluxo de óleo (Quintella, 2018).

Além das propriedades superficiais os biossurfactantes apresentam diversidade estrutural, baixa toxicidade, compatibilidade, maior biodegradabilidade e estabilidade funcional em condições extremas de temperatura, pH e salinidade. Alguns biossurfactante também possuem propriedades antifúngicas e antimicrobianas (Nitschke & Pastore, 2002; Yuliani, 2018).

### 3.1.2. Aplicações dos Biossurfactantes

Como mencionado anteriormente, a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial faz com que os surfactantes sejam amplamente utilizados na indústria. No entanto, cresce a preocupação com os impactos ambientais associados aos surfactantes sintéticos, incluindo sua persistência no ambiente e os possíveis efeitos adversos na saúde humana e nos ecossistemas aquáticos. Além disso, a busca por reduzir o uso de recursos não renováveis tem motivado a busca por alternativas mais sustentáveis (Jimoh & Lin, 2019).

Os biossurfactantes possuem grande potencial de aplicação industrial especialmente no setor de detergentes, cosméticos, produtos farmacêuticos, curtumes e alimentos, devido às suas propriedades de emulsificação, formação de espuma, limpeza, umedecimento e separação de fase (Varjani, *et al.*, 2021).

#### 3.1.2.1. Aplicação na indústria de alimentos

A utilização de biossurfactantes na indústria alimentícia tem recebido foco nos últimos anos devido ao aumento do interesse dos consumidores por produtos mais sustentáveis e de origem renovável. Neste contexto, os biossurfactantes podem ser utilizados como aditivos para modificação da viscosidade e textura dos alimentos ou incorporados em embalagens ativas, que são embalagens que contém propriedades que conservam o alimento por mais tempo, aumentando o tempo de prateleira, visto que alguns biossurfactantes possuem ação antimicrobiana, antioxidante, bem como a estabilidade na presença de variações na acidez,

alcalinidade e temperatura. Além destas propriedades, a baixa toxicidade dos biossurfactantes atende à demanda dos consumidores por alimentos mais naturais, contendo menos ingredientes artificiais e produtos quimicamente sintetizados comumente utilizados em alimentos, os quais, em excesso, podem representar riscos à saúde a longo prazo (Sarubbo *et al.*, 2022).

### 3.1.2.2. Aplicação dos biossurfactantes na área da saúde

Os biossurfactantes são reconhecidos por suas propriedades de permeabilização de membranas biológicas, pois têm a capacidade de criar poros e canais iônicos na bicamada lipídica que resultam na desestabilização da membrana levando à ruptura e à morte celular. Essas alterações estruturais que afetam a integridade das membranas biológicas podem explicar o principal mecanismo de ação antibiótica dos biossurfactantes, e suas atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antimicoplasmáticas e hemolíticas, aplicáveis na medicina, indústria farmacêutica e na indústria de cosméticos (Inès & Dhouha, 2015).

Giri (2021), relatou que biossurfactantes, como glicolipídeos e lipopeptídeos, podem danificar a membrana celular, levando à lise e conseqüente morte celular, inibindo assim a proliferação de células cancerígenas.

Os biossurfactantes também estão sendo considerados moléculas inovadoras no tratamento de doenças autoimunes, como alergias, asma, artrite e diabetes, que são causadas pela hiperatividade do sistema imunológico, devido ao seu potencial imunossupressor. Outras aplicações na área biomédica incluem a entrega de vacinas, transferência de genes, uso como adjuvantes, ligação com imunoglobulinas, inibição da formação de coágulos e promoção da lise de coágulos de fibrina (Sajid *et al.*, 2020).

### 3.1.2.3. Aplicação no Meio Ambiente

A contaminação do solo e da água com petróleo e metais pesados é um problema ambiental significativo que pode ocorrer devido a vazamentos, derramamentos acidentais, descarte inadequado de resíduos petrolíferos ou operações de exploração e produção de petróleo, além de contaminações oriundas de aterros sanitários mal gerenciados, estabelecimentos de serviços automotivos, uso indiscriminado de pesticidas na agricultura e descarte inadequado de corantes usados nos processos de tingimento de roupas. Para remediar

essas áreas contaminadas são utilizados vários métodos que podem ser químicos, físicos e biológicos. Neste contexto, a biorremediação é um processo biológico que utiliza microrganismos nativos ou adaptados e seus metabólitos para realizar a degradação dos contaminantes (Moro, 2018).

A utilização de biossurfactantes durante o processo de biorremediação tem se mostrado uma ferramenta valiosa, visto que esses compostos possibilitam uma melhor emulsificação e solubilização dos hidrocarbonetos, facilitando o acesso dos microrganismos a estes substratos e possibilitando da sua decomposição (Sun *et al.*, 2019).

Além disso, os biossurfactantes são capazes de formar complexos com os metais pesados e reter estes contaminantes em estruturas micelares, possibilitando a recuperação desses poluentes por outras técnicas como separação por membranas, por exemplo. (Santos, 2016)

#### 3.1.2.4. Aplicação na indústria de Óleo e Gás

No contexto da indústria de petróleo, devido à ação na interface dos fluídos e capacidade de redução de viscosidade do petróleo bruto, os biossurfactantes podem ser aplicados para tratamento da borra oleosa, biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, incorporados em formulação de lubrificantes, e até mesmo na recuperação melhorada de petróleo (Nitschke e Pastore, 2002).

Na exploração de um campo de petróleo, inicialmente aproveita-se a energia natural presente no reservatório, gerada pela diferença de pressão entre o reservatório e a superfície. No entanto, esta primeira etapa geralmente recupera apenas uma pequena fração do óleo presente no reservatório, variando de 5 a 15%. À medida a pressão no reservatório se torna insuficiente para forçar o óleo a superfície, outros métodos são utilizados buscando manter a produtividade. Na chamada de recuperação secundária são injetados fluidos nativos, geralmente água, no reservatório visando criar pressões adequadas para deslocar o óleo do interior da rocha reservatório. Quando o campo se torna maduro, métodos térmicos, físicos, químicos ou outros métodos não convencionais, podem ser utilizados para recuperação de petróleo. Estes métodos têm como objetivo melhorar parâmetros físico-químicos do óleo como a viscosidade e a

molhabilidade. Estes métodos são chamados de recuperação terciária ou Recuperação Avançada de Petróleo (EOR - *Enhanced Oil Recovery*) (Veloso *et al.*, 2014).

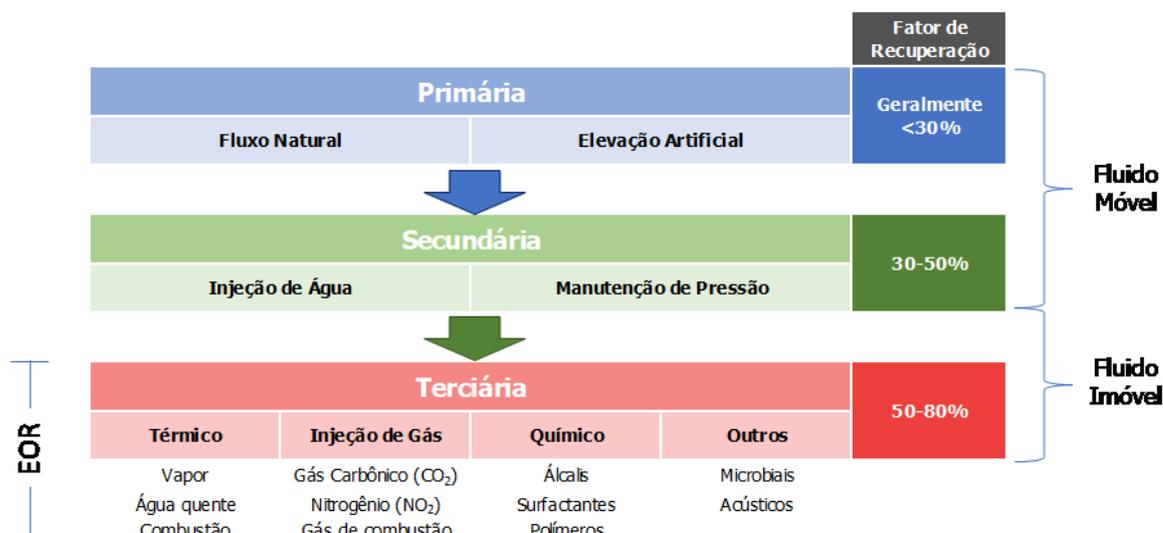


Figura 5. Técnicas de Revitalização de Campos. Fonte: CBIE, 2019.

Dentre os métodos de EOR, a Recuperação Microbiológica Avançada de Petróleo (MEOR) é uma técnica de recuperação na qual microrganismos e seus metabólitos são utilizados para facilitar o transporte do petróleo residual retido em um reservatório (Dos Santos, 2019).

Os biossurfactantes são capazes de reduzir a tensão interfacial entre o óleo e a água e formar emulsões estáveis podem melhorar a eficiência do processo, tornando-os candidatos potenciais para melhorar a recuperação de óleo (Santos, 2016).

Existem três abordagens distintas para a recuperação avançada de petróleo por meio de microrganismos (MEOR): Produção de biossurfactantes em reatores externos e posterior injeção ao reservatório de petróleo; Introdução de microrganismos estrangeiros produtores de biossurfactantes no reservatório e injeção de nutrientes diretamente no reservatório visando estimular os microrganismos nativos já presentes no ambiente a produzir biossurfactantes (Banat, 2010).

As abordagens que envolvem produção de biossurfactantes *in situ* são economicamente atrativas. No entanto, este é um processo complexo e demorado, já que as atividades bacterianas

específicas dependem das condições dos reservatórios, dessa forma os resultados são observados depois de semanas ou meses (Sharma, 2022).

Por outro lado, a produção de biossurfactantes *ex situ*, ainda enfrenta dificuldades na seleção dos microrganismos produtores e baixos rendimentos. Neste sentido, pesquisadores tem voltado seus esforços para a identificação de microrganismos e seleção de moléculas viáveis para aplicações em grande escala.

Pornsunthorntawee *et al.* (2008) demonstraram que tanto os biossurfactantes de *B. subtilis* PT2 quanto de *P. aeruginosa* SP4 superaram três surfactantes sintéticos na recuperação de petróleo de uma coluna de areia.

Ibrahim *et al.* (2013) reportaram que o biossurfactante produzido por *Serratia marcescens* demonstrou uma eficiência de MEOR de 76% na recuperação de petróleo bruto de uma coluna de areia, em comparação com o experimento de controle.

Álvarez *et al.* (2015) fizeram simulações de MEOR juntamente com o biossurfactante produzido por *B. amyloliquefaciens*, e obtiveram uma taxa de recuperação de hidrocarbonetos acima de 90%.

### 3.2. Ramnolipídeos

Das classes de biossurfactantes existentes, os do tipo glicolipídeos são bastante estudados. Eles são compostos por carboidratos combinados com ácidos alifáticos de cadeia longa ou ácidos alifáticos hidroxilados. Um dos melhores exemplos de glicolipídeos, com propriedade surfactante, é o ramnolipídeo, produzido por algumas espécies de *Pseudomonas* (Kronemberger, 2007).

De acordo com Long *et al* (2016), os ramnolipídeos têm o melhor potencial biossurfactante já conhecido, com vasto potencial de aplicação devido a propriedades antibacteriana, antifúngica, farmacêutica e detergente. Esses compostos são mais abundantemente produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, porém outros estudos verificaram sua produção em outras espécies de *Pseudomonas* e *Burkholderia* (Marchant e Banat., 2012).

Os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* são majoritariamente formados por uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a duas moléculas de ácido  $\beta$ -hidroxidecanóico, podendo ser classificados como tipo mono e di-ramnolipídeo, a depender da organização entre essas moléculas, sendo L-ramnosil- $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato e L-ramnosil-L-ramnosil- $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato, do tipo mono e diramnolipídeo respectivamente (Soberón-Chávez *et al.*, 2005). Outras organizações também já foram reportadas, apresentando variações nas cadeias alquílicas de acordo com o substrato utilizado e as condições de cultivo. (Perfumo *et al.*, 2006; Kronemberger, 2007)

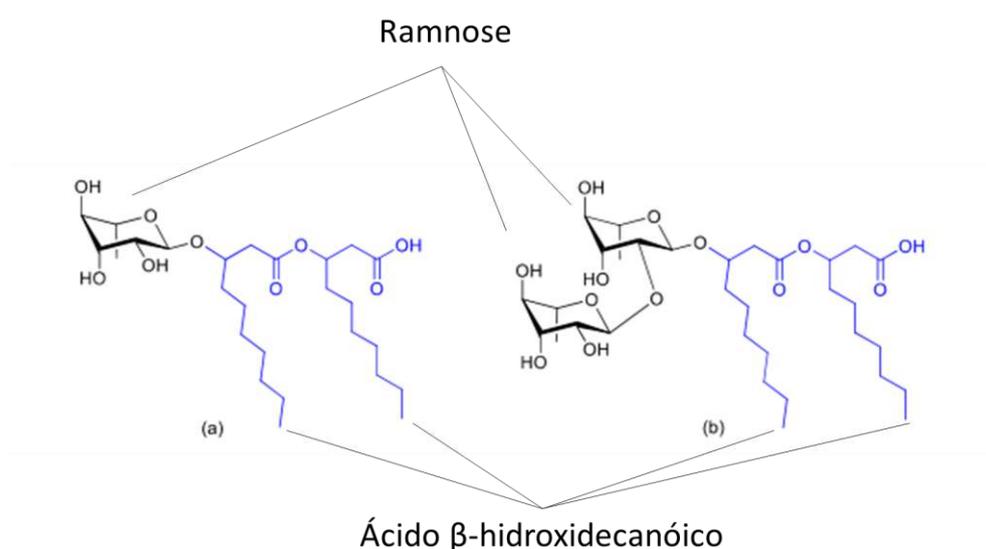


Figura 6. Estrutura dos Ramnolipídeos. a) Mono-ramnolipídeo; b) Di-ramnolipídeo

Os ramnolipídeos têm despertado interesse devido às suas propriedades químicas e biológicas favoráveis, como a ausência de toxicidade, biodegradabilidade e capacidade de reduzir a tensão superficial da água em condições extrema, e podem ser produzidos a partir de fontes de carbono sustentáveis (Jimoh e Lin, 2019).

No entanto, a produção destes biossurfactantes enfrenta desafios significativos para ser escalonada para um volume industrial. A baixa eficiência de fermentação de *Pseudomonas aeruginosa*, devido à inibição causada pelos próprios ramnolipídeos, e a complexidade dos dispositivos de separação e purificação resultam em um alto consumo de energia, que impacta diretamente no custo de produção deste biossurfactante (Zheng *et al.*, 2020).

### 3.2.1. Fatores que influenciam a produção de Ramnolipídeos

Muitos estudos atestam a aplicabilidade dos biossurfactantes e seus benefícios frente aos surfactantes sintéticos, no entanto, o uso em larga escala ainda é limitado devido a baixas produtividades e desafios na engenharia do processo. A eficiência e o rendimento do bioprocessamento são fatores fundamentais para garantir a viabilidade econômica e a competitividade do produto biotecnológico (Dolman *et al.*, 2019).

Durante a fermentação para produção de ramnolipídeos, o envelhecimento celular, o esgotamento de nutrientes e o acúmulo de ramnolipídeos e/ou subprodutos na fase estacionária da fermentação podem inibir a atividade celular e, conseqüentemente, a taxa de produção de ramnolipídeos (Jiang *et al.*, 2019).

A produção eficiente de ramnolipídeos requer a configuração adequada dos parâmetros de fermentação, pois esses fatores podem ter um impacto significativo no rendimento desses compostos. Os pesquisadores têm se dedicado a aprimorar a produção de ramnolipídeos por meio de rotas de otimização do sistema produtivo. Alguns dos principais parâmetros incluem o tipo de fonte de carbono, o momento de alimentação dos substratos, o pH, a temperatura, a taxa de aeração, o oxigênio dissolvido, a densidade celular e a capacidade de remover o produto no local (Eslami, 2020).

#### 3.2.1.1. Fonte de carbono

O desafio referente a produção em escala industrial dos biossurfactantes está diretamente relacionado ao custo de produção. Dentre as diversas estratégias que visam a melhoria da balança econômica dos surfactantes biológicos, o uso de resíduos orgânicos como fonte de carbono é uma oportunidade, principalmente no Brasil que é um país essencialmente agrícola (Marinho *et al.*, 2019).

Refinarias e indústrias de alimentos também geram uma quantidade significativa de resíduos oleosos, que podem ser aproveitados como um substrato rico para a produção de biossurfactantes. Devido à composição estrutural dos ácidos graxos presentes nesses resíduos, eles são capazes de induzir a produção de biossurfactantes (Varjani e Upasani, 2017). Esses resíduos são facilmente disponíveis e de baixo custo, o que contribui para a viabilidade

econômica do processo. No entanto, é importante a seleção de um substrato que forneça um equilíbrio adequado de nutrientes, que garanta tanto o crescimento celular quanto a produção do biossurfactante desejado (Duran *et al.*, 2020).

O uso de fontes de carbono de baixo peso molecular como glicerol, glicose e melão de cana de açúcar tem sido estudado como substrato para produção de ramnolipídeos. Embora estas fontes de carbono solúveis em água, possam ser usadas para a produção de ramnolipídeos, geralmente a produção é significativamente menor em comparação aos substratos oleosos, no entanto o custo desses substratos torna-os mais atrativos do ponto de vista econômico (Abbasi *et al.*, 2012; Noh, 2014).

No Brasil, o glicerol é um subproduto da indústria do biodiesel e apresenta um grande potencial como matéria prima para a produção de biossurfactantes (Júnior, 2022). Santos *et al.* (2002) investigaram a produção de ramnolipídeos pela cepa PA1 de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando glicerol como substrato. Como resultado, foi obtido um aumento de 62% na produtividade volumétrica com o aumento da concentração inicial de células de 0,32 para 3,0 g L<sup>-1</sup>, atingindo 23,2 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. A síntese de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* utilizando glicerol também foi descrita por Zhang *et al.* (2005) obtendo 15,4 g L<sup>-1</sup> do tensoativo, enquanto Silva *et al.* (2010) alcançaram 3,5 g L<sup>-1</sup> de ramnolipídeos, Salazar-Bryam (2016) obtiveram uma produção de 2,55 g L<sup>-1</sup> de ramnolipídeos em 72h, utilizando a cepa *P. aeruginosa* LBI 2A1 e 50 g L<sup>-1</sup> de glicerol como substrato. Júnior (2022) obteve concentração final de 8,3 g L<sup>-1</sup> de ramnolipídeos utilizando 45 g L<sup>-1</sup> de glicerol como substrato em 239h de fermentação em biorreator.

A tabela 1 apresenta outros exemplos de resíduos utilizados na produção de ramnolipídeos.

Tabela 1. Resíduos utilizados para produção de Ramnolipídeos. Compilado por este autor

Tipo de Resíduo	Microrganismo	Tipo de Cultivo	Rendimento (g L <sup>-1</sup> )	Fonte
Bagaço e casca de Batata	<i>P. azotoformans</i> AJ15	Batelada	1,2	Das and Kumar, 2018
Resíduo do Refino de Óleo de Palma Hidrolisado	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Batelada	0,5	Radzuan <i>et al.</i> , 2017
Ligninocelulósico	<i>Achromobacter</i> <i>sp.</i> (PS1)	Batelada sequencial “fill-and-draw”	4,5 –19,3	Joy <i>et al.</i> , 2019
Águas residuais de fábrica de óleo, milhocina e melaço de cana-de-açúcar	<i>P. aeruginosa</i> 112	Batelada	5,1	Gudiña <i>et al.</i> , 2016
Gordura Animal e Glicerol	<i>P. aeruginosa</i>	Batelada	17,0	Sohail and Jamil, 2019
Resíduos Alimentares	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BU-03	Batelada Alimentada	10,2	Johnravindar <i>et al.</i> , 2022

### 3.2.1.2. Nitrogênio e Parâmetros Operacionais

A escolha de um substrato de baixo custo afeta a economicidade do processo de produção de biossurfactantes. No entanto, mesmo após a seleção do substrato, ele precisa de uma otimização adicional, dependendo do organismo utilizado para a produção. Parâmetros como pH, temperatura, oxigenação, agitação, e disponibilidade de nutrientes são fundamentais para a obtenção de um rendimento ideal de biossurfactantes. A formulação do meio de cultura de acordo com a fonte de carbono, as condições de cultivo e parâmetros físico-químicos do processo de fermentação precisam ser otimizadas para maximizar a produção de biossurfactantes (Sarubbo *et al.*, 2022).

O nitrogênio é outro fator importante para a produção de biossurfactantes por microrganismos. As fontes de nitrogênio, tanto inorgânicas quanto orgânicas, desempenham um papel crucial no crescimento microbiano, no desenvolvimento dos componentes celulares e

na síntese de metabólitos bioativos envolvidos na produção de biossurfactantes (Jimoh e Lin, 2019).

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* foi relatada como capaz de utilizar nitratos, amônio e ureia como fontes de nitrogênio para a produção de seus biossurfactantes (Santos *et al.*, 2002; Santa Anna *et al.*, 2002). Além disso, as fontes orgânicas de nitrogênio, como extrato de levedura, também têm se mostrado importantes para aumentar a atividade e a eficiência na produção de biossurfactantes (Abbasi *et al.*, 2012).

A razão carbono-nitrogênio (C:N) também é um parâmetro influente para a produtividade de ramnolipídeos. Uma vez que a produção mais significativa de ramnolipídeos ocorre durante a fase estacionária, uma razão C:N equilibrada é essencial para uma produção ótima do biossurfactante, tendo em vista que uma razão desequilibrada pode levar a um crescimento excessivo de células (Varjani e Upasani, 2017).

A produção eficiente de ramnolipídeos requer a pré-condição de limitar o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*. Isso é alcançado por meio do rápido esgotamento da fonte de nitrogênio no meio, enquanto se mantêm elevados níveis de carbono. O processo de batelada simples e a batelada alimentada são as mais viáveis e menos exigentes para alcançar essas condições. Essas modalidades são preferíveis devido à facilidade de acompanhamento, equipamento e manutenção do processo. A batelada alimentada, em particular, é uma abordagem atraente para uma ampla gama de processos fermentativos, pois é aplicável em sistemas onde o agente microbiano é sensível a fenômenos de inibição por substratos com cinética de formação de produto não associada ao crescimento, como é o caso dos ramnolipídeos (Tavares, 2007).

#### 3.2.1.3. Estratégias Fermentativas

Batelada, batelada alimentada e processo contínuo são estratégias para o processo de fermentação e se diferem pela maneira que o substrato é adicionado ao processo e o produto retirado.

No processo de cultivo em batelada, todos os nutrientes necessários para o crescimento das bactérias e produção dos bioprodutos desejados são adicionados ao meio de cultura antes do início do cultivo, e o produto só é retirado do fermentador no final do processo. Já no

processo contínuo um determinado volume de meio de cultivo é continuamente adicionado ao fermentador e parte é removido ao mesmo tempo, a fim de manter um volume de cultura constante. O processo de batelada alimentada é uma estratégia de fermentação intermediária onde o meio de cultivo fresco contendo o substrato é adicionado ao fermentador sem que o produto seja retirado (Eslami *et al.*, 2020).

Várias bateladas alimentadas podem ser realizadas para aumentar a produtividade de um determinado bioproduto, esse processo é chamado de batelada sequencial ou processo cíclico ou semi-contínuo. Nessa estratégia, uma parte da cultura é retirada ao final da batelada e utilizada como inóculo em um meio de cultura fresco, enquanto o restante da cultura antiga é utilizado na recuperação do produto. Essa abordagem apresenta diversas vantagens, como a obtenção semi-contínua do produto, a diluição de subprodutos tóxicos no meio de cultura e a redução do tempo de inatividade necessário para limpeza, preparação, esterilização do fermentador. Isso permite uma produção contínua do produto desejado, otimizando a eficiência do processo e reduzindo os custos operacionais (Blunt *et al.*, 2022).

Os processos contínuos e semi-contínuos são estratégias de fermentação que tem recebido atenção no que diz respeito ao potencial de aumento de produtividade de ramnolipídeos.

Trummler *et al.* 2003 sob condições limitantes de nitrogênio, obtiveram 45 g L<sup>-1</sup> de concentração de ramnolipídeos em um processo de batelada alimentada com óleo de colza como fonte de carbono. A aplicação de uma estratégia de alimentação contínua por Lee *et al.* (2004) usando óleo de peixe, resultou em 22,7 g L<sup>-1</sup> de ramnolipídeos.

He *et al.* 2017 avaliaram a produção de ramnolipídeos em batelada sequencial utilizando a estratégia de “enchimento e descarte” (*fill and draw*) utilizando óleo de milho como substrato e obteve um aumento 163% e 102% de aumento em relação aos processos tradicionais de batelada e batelada alimentada, respectivamente.

Outro estudo a respeito da produção de ramnolipídeos por batelada alimentada foi realizado por Johnravindar *et al.* (2022) que utilizando resíduos alimentares produziram 10,25 ± 1,34 g L<sup>-1</sup> de ramnolipídeos em 43 horas.

Quanto ao modo de cultivo os processos fermentativos para produção de ramnolipídeos podem ser do tipo submerso (FS) ou em estado sólido (FES). Na FS, o microrganismo é cultivado em um meio líquido que contém os nutrientes necessário para o seu crescimento. A produção de ramnolipídeos em processos submersos geralmente é realizada em sistemas de fermentação aeróbica com alta agitação e dispersão de bolhas de oxigênio ou de ar. Nesses sistemas, ocorre formação extensiva e estável de espuma, o que causa problemas operacionais graves, como crescimento de células nas paredes do biorreator, transbordamento de espuma, obstrução de filtros de saída de gás e maior probabilidade de contaminação (Sodagari, 2014).

Na FES, não há água livre presente no substrato. Nesse processo a umidade fornecida é suficiente apenas para permitir o crescimento microbiano e atividade metabólica. O substrato sólido pode ser tanto um material inerte que suporta o crescimento dos microrganismos, como também pode ser a fonte de nutrientes (Da Rosa, 2008).

El-Housseiny *et al.* (2019) produziram ramnolipídeos em FES utilizando uma mistura 50-50 de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de milho incorporado a uma solução 5% v/v de glicerol e produziu 67% a mais de biossurfactante em relação a fermentação submersa.

Contudo, é importante notar que a literatura atual carece de informações abrangentes relacionadas aos fenômenos de transporte e taxas de crescimento para a FES. Dessa forma, ainda existem desafios relacionados ao gerenciamento do processo (De Mélo, 2016).

### 3.3. Recuperação e Purificação

Nos bioprocessos, as etapas de *downstream* são aquelas relacionadas à separação e à purificação dos produtos, além de estarem associadas à recuperação de algum insumo. De acordo com Sarachat *et al.* (2010), cerca de 40-60% do custo total de produção de produtos biotecnológicos está relacionado as etapas de recuperação e purificação. Além da otimização da produção, o processo de separação e extração é uma etapa que limitante para a produtividade do bioprocessos (Chen *et al.*, 2021).

Najmi *et al.* (2018) afirmam que os custos de downstream dos biossurfactantes pode representar de 60% a 80% dos custos totais de produção. Estes custos prejudicam a competitividade dos biossurfactantes frente aos surfactantes sintéticos e dificultam a sua utilização industrial (Sarubbo *et al.*, 2022).

Diversos fatores são considerados para a escolha do melhor processo de separação de bioprodutos, tais como sua origem celular (intracelular ou extracelular), sua polaridade e interações moleculares, solubilidade, além das características físico-químicas do meio de fermentação como viscosidade, densidade, impurezas e subprodutos bem como as características do produto de interesse como a massa molecular, concentração, solubilidade, polaridade, volatilidade (Assis, 2014; Pereira *et al.*, 2008).

Existem várias técnicas que podem ser utilizadas para recuperar biossurfactantes a partir da fermentação microbiana, sendo a extração por solvente a mais comumente utilizada. No entanto, o uso de grandes volumes de solventes orgânicos nesse processo aumenta os custos e pode causar danos ao meio ambiente, quando manuseados e descartados de maneira inadequada. Por isso, estão sendo investigadas tecnologias de extração alternativas, e ambientalmente amigáveis, como adsorção em carvão ativado ou resinas de poliestireno, centrifugação, cromatografia de troca iônica, fracionamento de espuma e ultrafiltração/ultrafiltração. Essas tecnologias oferecem a vantagem de obter biossurfactantes altamente puros a um custo mais baixo e em menos tempo, além de permitir a reutilização dos materiais de extração (Sarubbo *et al.*, 2022).

A integração da produção e separação de biossurfactantes é uma abordagem promissora para otimizar a eficiência e a viabilidade econômica. Métodos de separação *in situ* têm sido explorados, permitindo a recuperação contínua dos biossurfactantes durante a fermentação, nos quais os biossurfactantes são separados e recuperados diretamente do meio de cultura durante o processo de produção. Isso reduz a necessidade de etapas adicionais de separação e purificação e permite a obtenção de biossurfactantes em alta pureza. Técnicas avançadas de purificação, como cromatografia e ultrafiltração, também são empregadas para obter biossurfactantes de alta pureza. A integração dessas etapas visa simplificar o processo, reduzir os custos de produção e melhorar a qualidade dos biossurfactantes obtidos (Dolman, 2019).

### 3.3.1. Processos de Separação por membrana

Uma membrana pode ser definida como uma barreira semipermeável de separação física entre duas e que impede o transporte de um determinado componente por uma dessas fases, sob o efeito de uma força motriz (Habert *et al.*, 2006). A partir dos anos 60, os Processos de Separação por Membrana (PSM) passaram a ser muito utilizados na indústria pois apresentam vantagens como a economia energética, facilidade de instalação, operação e possibilidade de integração com outros processos de separação convencionais (Braga Junior, 2007).

Os Processos de Separação por Membrana (PSM) podem ser classificados de acordo com a força motriz utilizada no processo. As técnicas mais comumente empregadas nos PSM utilizam gradiente de pressão como força motriz. Nesse caso, a diferença de pressão entre os dois lados da membrana impulsiona a separação dos componentes desejados. Outros processos podem empregar o gradiente de concentração, gradiente elétrico ou gradiente de pressão parcial (Amaral, 2009).

Dos Processos de Separação por Membrana (PSM) que utilizam como força motriz o gradiente de pressão, os mais amplamente utilizados na indústria são a microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e osmose inversa (OI), esses processos se diferem tanto pela pressão a eles aplicada, quanto ao tamanho do poro da membrana. A tabela 2 apresenta um resumo das características desses processos.

*Tabela 2. Características dos PSM. Adaptado de Galvão e Gomes (2015)*

<b>Processo</b>	<b><math>\Delta P</math> (bar)</b>	<b>Diâmetro do Poro (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
Microfiltração (MF)	< 2	0,09-10
Ultrafiltração (UF)	1 - 7	0,004-0,1
Nanofiltração (NF)	4 - 35	0,001-0,005
Osmose reversa (OR)	15 - 150	< 0,002

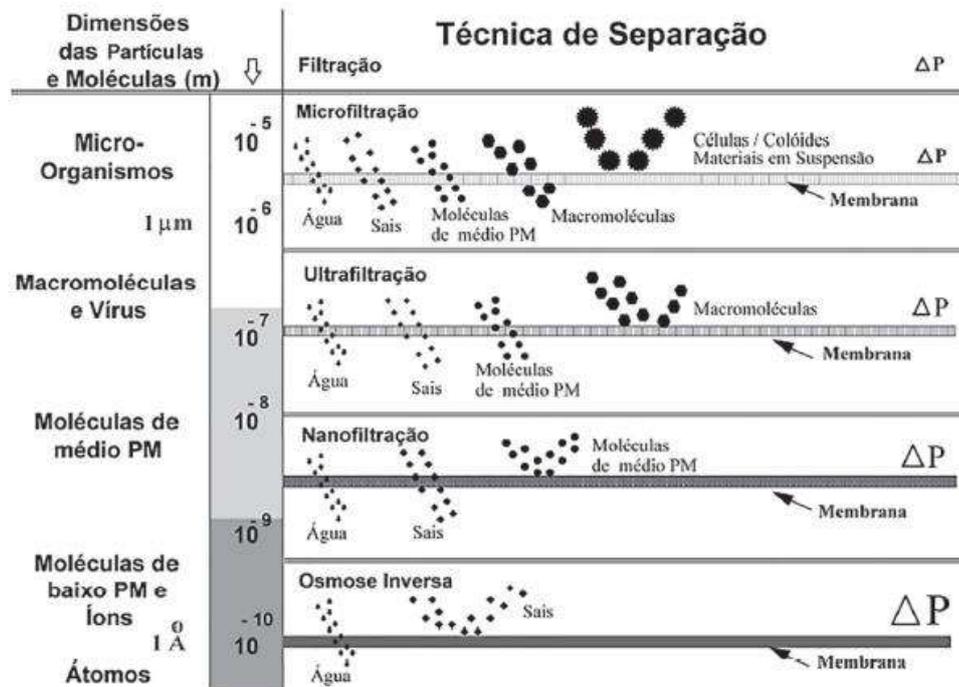


Figura 7. Partículas e moléculas retidas de acordo com o tipo de PSM. Fonte: Galvão e Gomes (2015)

A integração das membranas no campo da engenharia de bioprocessos se dá devido à capacidade das membranas de serem utilizadas em diversos processos tanto em fermentadores quanto em biorreatores. Essas aplicações incluem transporte de gases, transferência seletiva de nutrientes, separação e purificação de produtos de valor agregado, análise de concentração de analitos como sensores, processamento de proteínas e outros produtos na etapa de purificação, além da esterilização de compostos sensíveis ao calor. Desta forma, as membranas desempenham um papel versátil e essencial nessas operações (Singh *et al.*, 2020).

Os processos de separação por membrana são apontados como processos promissores para a recuperação de biossurfactantes pois são capazes de separar os produtos de metabolismo de células inteiras, evitando assim um crescimento indesejado de biomassa pós-biorreação (Rodrigues *et al.*, 2006).

A separação por membrana tem a vantagem de permitir que a fermentação e a separação sejam completamente desacopladas em um processo integrado. Em um sistema de purificação de biossurfactantes, por exemplo, pode ser inicialmente utilizado um processo de ultrafiltração para uma separação das células do meio contendo os biossurfactantes, possibilitando o reciclo de células ao biorreator e seu reaproveitamento no processo. Uma segunda etapa de

ultrafiltração pode ser então adicionada, visando a concentração e purificação de bioproduto, visto que a UF permite a passagem da água e pequenas moléculas, mas mantém o biossurfactante retido no meio de cultivo (Dolman *et al.*, 2019).

Chen *et al.* (2007) estudaram a recuperação da surfactina através da técnica de *salting-out* com sulfato de amônio, ultrafiltração (UF), e o processo híbrido. Somente o processo de *salting out* com sulfato de amônio proporcionou um rendimento de recuperação na faixa de 84-93%, e uma pureza na faixa de 67-69%. Somente o processo de UF apresentou alta pureza (~83%) mas baixo rendimento de recuperação (<68%). Já o processo híbrido de *salting-out* (primeiro) e UF proporcionou um rendimento de recuperação de 81% e uma pureza de 78%. Os resultados apresentados demonstraram o potencial promissor de aplicação do processo híbrido para a recuperação de surfactina.

Isa *et al.* (2008) desenvolveram um processo de ultrafiltração para recuperação de surfactina em escala de laboratório com membranas de celulose regenerada (RC) e poliétersulfona (PES) em diferentes pressões e obtiveram uma taxa de recuperação de 94% e 96% de pureza do bioproduto.

Coutte *et al.* (2013) desenvolveram um bioprocesso integrado para produção de surfactina em um biorreator de membrana sem bolhas (BMBR). O processo foi realizado em dois tanques, o primeiro biorreator foi continuamente alimentado com meio fresco e o meio de cultivo era ultrafiltrado a uma taxa de  $0,5 \text{ L min}^{-1}$ . Esta primeira etapa garantia a retenção total e reciclo de células. O permeado contendo substratos residuais e metabólitos, como ácidos orgânicos e surfactina, era então coletado dentro do tanque 2, onde era realizada etapa de ultrafiltração para a concentração e purificação contínuas de surfactina. Neste estudo, foi possível extrair e purificar continuamente várias gramas de biossurfactante, com pureza de até 95%.

Apesar de diversos artigos apresentarem os processos de separação por membranas como alternativas promissoras para a recuperação de biossurfactantes, ainda existem *gaps* que precisam ser avaliados para esta tecnologia, principalmente no contexto da recuperação de ramnolipídeos. Dessa forma, o presente trabalho se propõe a avaliar a ultrafiltração como tecnologia de recuperação de ramnolipídeos, e concentração de biomassa em um processo de alimentação semi-contínuo.

## 4. Metodologia

### 4.1. Cultivos

#### 4.1.1. Microrganismo

Para a produção dos ramnolipídeos foi utilizada a cepa LFM634 da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* obtida da coleção do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LABIM) do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os *slants* contendo os microrganismos foram mantidos a -80 °C.

#### 4.1.2. Pré-Inóculo

Para o preparo do pré-inóculo, o conteúdo do *slant* foi adicionado a Erlenmeyer de 1L contendo 300mL de meio de cultivo com a seguinte composição (meio de crescimento): NaNO<sub>3</sub> (1,0 g L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,2 g L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (7,0 g L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3,0 g L<sup>-1</sup>), Peptona (5,0 g L<sup>-1</sup>), Extrato de Levedura (5,0 g L<sup>-1</sup>), Glicerol (30 g L<sup>-1</sup>) (Santos *et al.*, 2016). O glicerol, utilizado como fonte principal de carbono, foi obtido após decantação da glicerina bruta (74% de pureza) cedida pela Petrobras, coletada da produção de biodiesel na Usina de Biodiesel de Montes Claros.

Após esterilização em autoclave por 20 minutos em pressão 1 bar, os frascos foram incubados a 30 °C e 200 RPM por aproximadamente 36 horas. Após o período de crescimento mencionado, o meio rico em células atuou como pré-inóculo para a produção de ramnolipídeos.

#### 4.1.3. Cultivo em Frascos

Para a produção de ramnolipídeos foram preparados, em três erlenmeyers de 1L, 450 mL de meio de cultivo com a seguinte composição (meio mínimo): NaNO<sub>3</sub> (5,54 g L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,2g L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (7,0g L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3,0g L<sup>-1</sup>), Extrato de Levedura (2 g L<sup>-1</sup>), Glicerol (30gL<sup>-1</sup>) (Santos *et al.*, 2016). Os frascos contendo o meio de cultivo foram esterilizados em autoclave por 20 minutos em pressão de 1 barg.

Após o resfriamento dos frascos, foram adicionados, em condições de assepsia em capela de fluxo laminar, 50 mL do meio rico em células (pré-inóculo), totalizando 500 mL de volume de meio nos Erlenmeyers destinados ao experimento.

Foram retiradas amostras de 2 mL em frascos tipo eppendorf para análises de crescimento celular e concentração de glicerol e concentração de ramnolipídeos diariamente.

## 4.2. Métodos Analíticos de Quantificação

### 4.2.1. Biomassa

Alíquotas das amostras retiradas foram diluídas de acordo para coincidirem com a faixa linear da curva padrão de peso seco, a partir da medida da absorbância em um espectrofotômetro a 600 nm, utilizando o fator (f) de 0,8162; onde  $[Biomassa(g L^{-1}) = (f) \cdot Abs]$  calculado para esta cepa por Júnior (2022). Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a  $10^4$  rpm e o sobrenadante reservado para a quantificação de glicerol e ramnolipídeos.

### 4.2.2. Glicerol e Ramnolipídeos

Para a determinação da concentração do glicerol foi retirada uma alíquota de amostra e feita diluição de 10 vezes em água, filtrada e injetada no HPLC. A quantificação de ramnose foi realizada pelo método descrito por (Almeida, 2011), que consiste na acidificação da amostra até pH próximo de 3 com ácido sulfúrico concentrado, seguido de banho-maria a 98 °C por 4 horas. Após o período determinado a amostra é neutralizada com hidróxido de sódio, filtrada e injetada no HPLC. A quantificação de ramnolipídeos é feita por conversão matemática a partir de uma curva previamente elaborada por espectrometria de massas.

Para ambas as análises (ramnose e glicerol) em HPLC foi usada temperatura de 40°C, utilizando como fase móvel solução 0,0032 M de ácido sulfúrico com fluxo de 0,6 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de amostra igual a 20 mL e utilizando a coluna HPX-87H (BioRad - 300mm x 7,8 mm).

## 4.3. Sistema de Ultrafiltração e Procedimento Experimental

### 4.3.1. Módulo de Ultrafiltração

As fibras ocas de PVDF reforçadas da *Hinada Water Treatment* foram utilizadas para a construção de módulos de permeação e tem suas especificações descritas na tabela 3.



Figura 8. Aspecto das membranas

Tabela 3. Especificações da Membrana (Tabela do Fabricante)

Material	Fibra Oca -PVDF reforçado
Diâmetro Interno/Externo	1,0/2,2 mm
Tensão	Acima de 100MPa
Fluxo para água	10 – 25 L m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup>
Temperatura de Operação	5 °C – 45 °C
pH	2-12
Pressão de Operação	0,2 – 0,4 Mpa
Turbidez da água de saída	Menor que 1 NTU
Método de Filtração	Sucção – Retrolavagem
Tamanho do poro	0,03 – 0,05 µm
Densidade do poro	65 – 70%
Espessura PVDF	80 – 100 µm

O modelo proposto para a configuração dos módulos de UF deste trabalho é do tipo alça com o auxílio de um tubo de poliuretano de 16mm selado com cola araldite, e foi desenvolvido no Laboratório de Processos de Separação com Membranas e Polímeros (PAM – COPPE/UFRJ). O módulo foi acoplado a um tubo de poliuretano transparente utilizando engates de silicone e conectores de PVC.

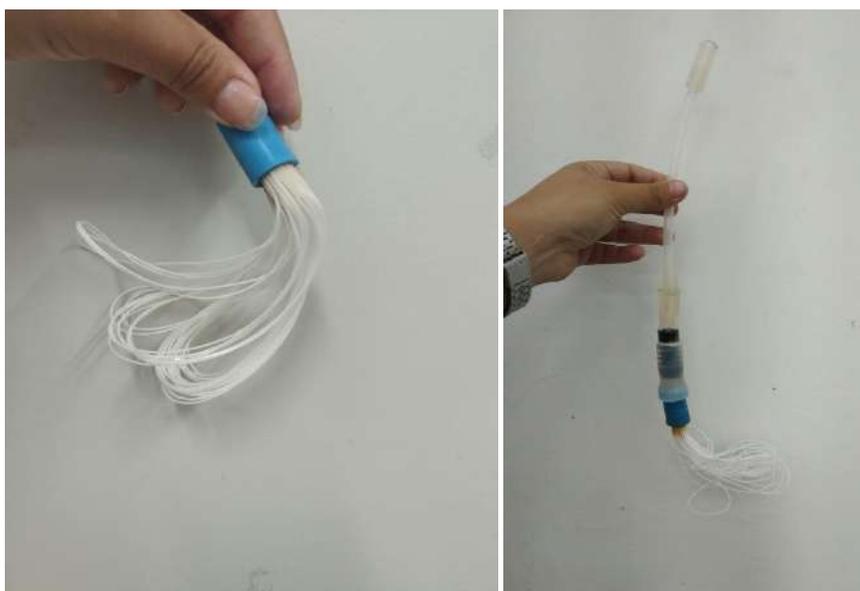


Figura 9. Módulo de Ultrafiltração. Elaboração própria

Cada módulo foi construído com 32 fibras com 20cm de comprimento, resultando em 0,044 m<sup>2</sup> de área de filtração.

#### 4.3.1. Ultrafiltração

A ultrafiltração aconteceu com aproximadamente 100 mL de meio de cultivo e o tempo final do procedimento foi registrado para a realização do cálculo do fluxo. O fluxo de permeado (J) foi determinado em função do tempo pela equação abaixo:

$$\text{Equação 1 : } J = V / t * A$$

Também foi avaliada a permeabilidade das membranas pela equação 2 abaixo:

$$\text{Equação 2 : } \text{Permeabilidade} = \frac{J}{P}$$

Onde: V é o volume coletado em um determinado tempo (L), t é o tempo no qual a amostra foi coletada (h) e A é a área de filtração da membrana (m<sup>2</sup>) e P é a pressão (bar).

A eficiência da ultrafiltração obtida nos experimentos foi calculada pela equação 3.

$$\text{Equação 3 : Eficiência da Ultrafiltração (\%)} = \frac{C_p}{C_f} \times 100$$

Onde  $C_p$  é a concentração obtida no permeado e  $C_f$  é a concentração no frasco antes da ultrafiltração.

#### 4.3.2. Limpeza

Após o uso as membranas eram imersas em béqueres com 500mL de água ultrapura e postas por 10 min em uma lavadora ultrassônica com frequência ultrassônica de 40kHz. Em seguida eram imersas em uma solução de 1% p/v de NaClO por 15 min e enxaguadas e armazenadas com água ultrapura.

Para serem utilizadas as membranas eram novamente imersas em uma solução de 1% p/v de NaClO por 15 min, em seguida eram enxaguadas com água ultrapura, imersas em um béquer com água ultrapura e levadas ao fluxo de luz U.V. por 15 min. A transferência das membranas para os frascos e a retirada destas sempre era realizada dentro do fluxo de luz U.V.

#### 4.3.3. Planejamento Experimental

Foram realizadas fermentações do tipo batelada em dois frascos de 1000mL com meio 500 mL de volume útil. Destes dois frascos, um, chamado controle, não foi realizado a ultrafiltração e o outro, chamado ultrafiltrado, em que a ultrafiltração foi realizada. Nos frascos ultrafiltrados, a alimentação era realizada imediatamente após a ultrafiltração. Ambos os frascos eram alimentados ao mesmo tempo

As diferenças operacionais adotadas em cada experimento serão mais bem elucidadas no capítulo de resultados e discussão. A tabela 4 apresenta um resumo das principais características de cada experimento realizado.

Tabela 4. Resumo do planejamento experimental

N°	Tipo de Cultivo	Alimentação	Alimentação
<b>Experimento 1</b>	Batelada alimentada	30 g L <sup>-1</sup> de Glicerol	Alimentação após 144h do início do experimento.
<b>Experimento 2</b>	Batelada alimentada	30 g L <sup>-1</sup> de Glicerol	1° Alimentação após 118h do início do experimento. 2° Alimentação após 235h da primeira alimentação.
<b>Experimento 3</b>	Batelada alimentada	20 g L <sup>-1</sup> de Glicerol	Alimentação após 48h do início do experimento.
<b>Experimento 4</b>	Batelada alimentada	1° Alimentação - 20 g L <sup>-1</sup> de Glicerol 2° Alimentação – 20 g L <sup>-1</sup> de Glicerol e 2,58 g L <sup>-1</sup> de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1° Alimentação após 48h do início do experimento. 2° Alimentação após 170h da primeira alimentação

## 5. Resultados

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos quanto à investigação da produção de ramnolipídeos em batelada alimentada por pulsos em períodos de limitação de nitrogênio e, quanto à recuperação deste produto por membrana de ultrafiltração.

Em todos os ensaios dois frascos foram avaliados, o frasco controle em que a ultrafiltração não foi realizada, apenas alimentação e, o frasco ultrafiltrado onde foram realizadas alimentação e ultrafiltração. Nos gráficos apresentados a alimentação será representada por uma reta azul e a ultrafiltração será indicada por uma seta.

Os experimentos 1, 2 e 3 tiveram como principal objetivo realizar um levantamento dos principais problemas e limitações da metodologia experimental e fornecer um panorama do efeito das principais variáveis envolvidas no processo produtivo, e a fermentação 4 têm como objetivo avaliar se há retomada na produção de ramnolipídeos após adição de nitrogênio.

### Avaliação da produção de ramnolipídeos em limitação de nitrogênio

No primeiro experimento, os módulos de ultrafiltração foram adicionados aos frascos no momento da inoculação visando reduzir os riscos de contaminação com a sua manipulação. Para que as condições de crescimento fossem similares, foram colocados módulos de ultrafiltração em ambos os frascos, evitando possíveis alterações hidrodinâmicas que seriam diretamente relacionadas ao aporte de oxigênio para as células.

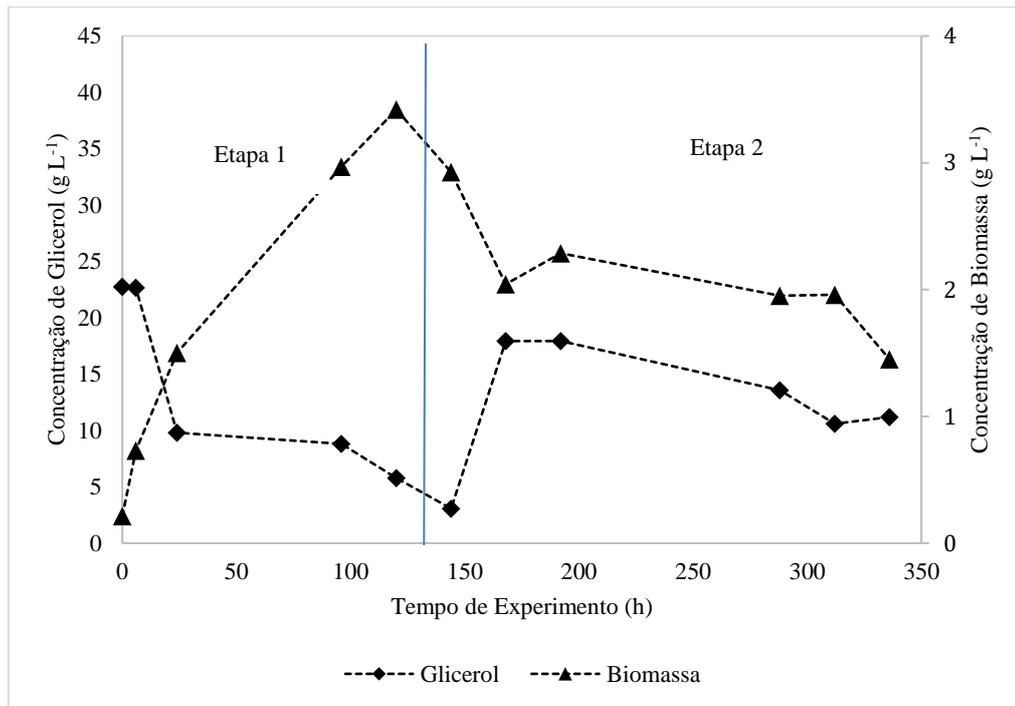


Figura 10. Experimento 1 - Gráfico de crescimento de Biomassa e Consumo de Glicerol para o frasco controle.

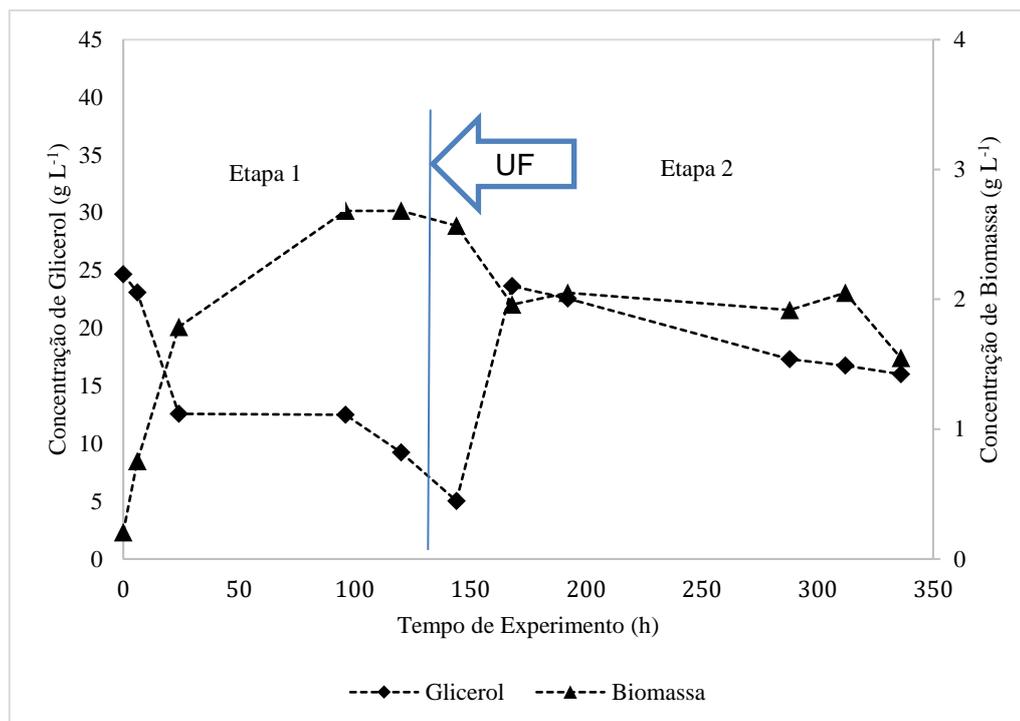


Figura 11. Experimento 1 - Gráfico de crescimento de Biomassa e Consumo de Glicerol para o frasco ultrafiltrado.

Inicialmente observou-se intensa formação de espuma nos frascos, como mostra a figura 12. Segundo Gruber et al (1993), o uso da aeração submersa convencional para a produção de biossurfactantes do tipo ramnolípido pode levar a formação de espumas muito estáveis.

Dessa forma, a formação de espuma foi atribuída associação da presença dos módulos de ultrafiltração dentro dos frascos nas incubadoras de agitação durante o período de experimento e a produção dos ramnolípido. Os módulos funcionaram como agitadores mecânicos e promoveram intensa formação de espuma nos frascos. Além disso, foi observado que, devido algumas conexões dos módulos serem diferentes umas das outras, a agitação empregada dentro dos frascos era diferente. Como é possível observar a figura 12 apresenta uma camada de espuma diferente nos frascos, fruto dessa divergência de tamanho e forma das conexões dos módulos.

Percebe-se, pela comparação das figuras 10 e 11, que o frasco controle obteve maior crescimento celular, provavelmente influenciado pela maior aeração que sofreu devido a presença de um módulo maior.



Figura 12. Formação de espuma nos frascos agitados devido a presença do módulo de ultrafiltração

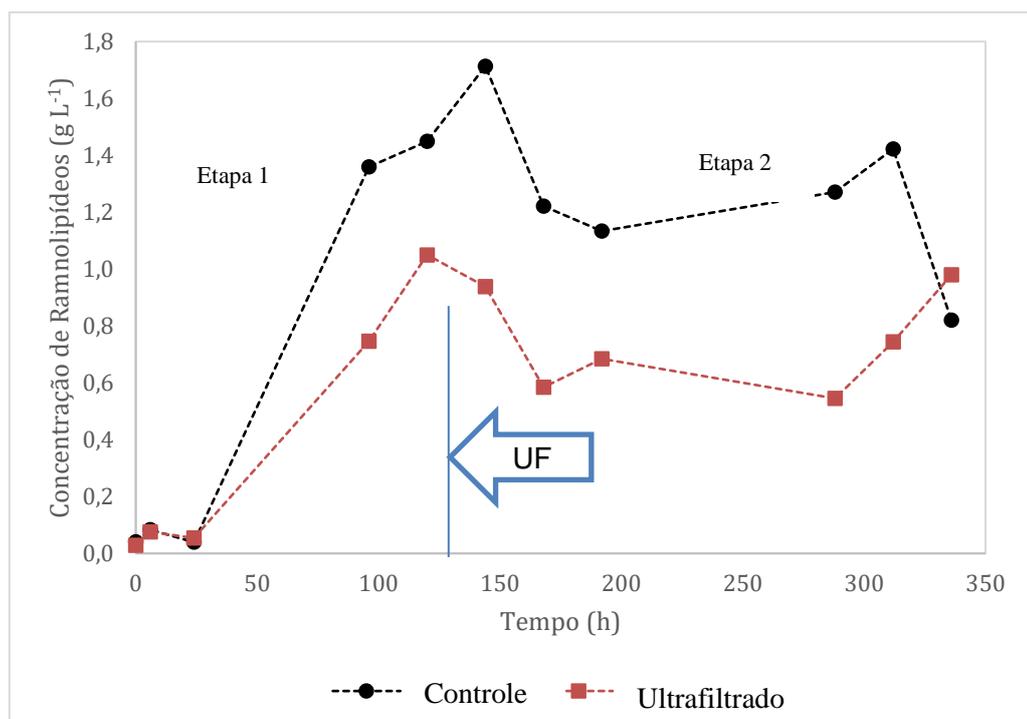


Figura 13. Experimento 1 – Comparação da produção de ramnolipídeos dos frasco controle e ultrafiltrado.

Como é possível observar na figura 13, por consequência da maior aeração devido a presença do maior módulo, o frasco controle também apresentou uma maior produção de ramnolipídeos, alcançando o pico até próximo ao ponto equivalente a 144 horas de experimento.

De acordo com Tavares (2007), diferentes quantidades de oxigênio fornecido ao meio podem gerar múltiplos resultados, desde a geração de biomassa até a produção de ramnolipídeos, passando pela dinâmica de produção de diversos outros fatores de virulência. Isso pode contribuir tanto para a melhoria de produção de ramnolipídeos como também para o desenvolvimento de uma estratégia de produção em que os fatores de virulência se encontrem nos mais baixos níveis possíveis. Desta forma, as diferenças físicas no módulo podem ter ocasionado a promoção de diferentes níveis de oxigênio nos frascos.

Destaca-se também que a produtividade do biossurfactante foi baixa, de forma geral, comparado aos valores encontrados na literatura, Silva *et al.* (2010) alcançaram  $3,5 \text{ g L}^{-1}$ , Salazar-Bryam (2016) obtiveram uma produção de  $2,55 \text{ g L}^{-1}$  e Júnior (2022) obteve concentração de  $8,3 \text{ g L}^{-1}$  de ramnolipídeos utilizando glicerol, como já citado anteriormente. Apesar dos parâmetros de cultivo desses trabalhos não serem os mesmos considerou-se que melhorias poderiam ser tomadas para o aumento da produção. Foi atribuída a baixa produtividade à alta relação entre volume de meio de cultivo e volume total do frasco tipo Erlenmeyer. Toda a produção (parâmetros e formulação de meio de cultivo) havia sido otimizada para a relação 3:10 (300 mL em frascos com capacidade para 1.000 mL), mas no presente trabalho foi utilizada a proporção 5:10, como descrito na seção de metodologia. Isto foi necessário para se acomodar o módulo com as membranas de forma completamente submersa e, mesmo com o próprio módulo atuando como promotor de turbulência, reduziu drasticamente o aporte de oxigênio transferido ao meio ao longo da produção. Porém, isto não afeta a análise proposta no trabalho, realizada de forma comparativa.

Esperava-se, no entanto, que após a alimentação, ambos os frascos retomassem a produtividade após a hora 144, posterior a ultrafiltração/alimentação, o que não aconteceu. Ao final da fermentação percebe-se ainda que o frasco controle apresentou uma queda na concentração de ramnolipídeos.

A produtividade e o  $Y_{p/s}$  do processo foram avaliados em duas etapas distintas, a primeira avaliando o intervalo do início do experimento e a primeira ultrafiltração, e a segunda a partir da alimentação até a finalização do experimento.

Tabela 5. Experimento 1 – Resultados de produtividade volumétrica e  $Y_{p/s}$

Etapa	Intervalo (h)	Horas	Frasco controle		Frasco ultrafiltrado	
			Pp ( $\text{mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	$Y_{p/s}$ ( $\text{gg}^{-1}$ )	Pp ( $\text{mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	$Y_{p/s}$ ( $\text{gg}^{-1}$ )
1	0 - 144	144	11,6	0,08	6,3	0,04
2	168 - 336	168	-2,4	-0,06	2,4	0,05

Observa-se na tabela 5 que a produtividade e o fator de conversão de substrato para produto do frasco controle é maior que a do frasco ultrafiltrado na primeira etapa. No entanto, na segunda etapa a produtividade do frasco controle se torna negativa, bem como seu fator de conversão. Isso porque ao final da produção parte dos ramnolípídeos produzidos no frasco controle foram consumidos.

O segundo ensaio teve como objetivo avaliar os efeitos do aumento do tempo de cultivo na produção dos ramnolípídeos em condições de cultivo semelhantes ao primeiro ensaio.

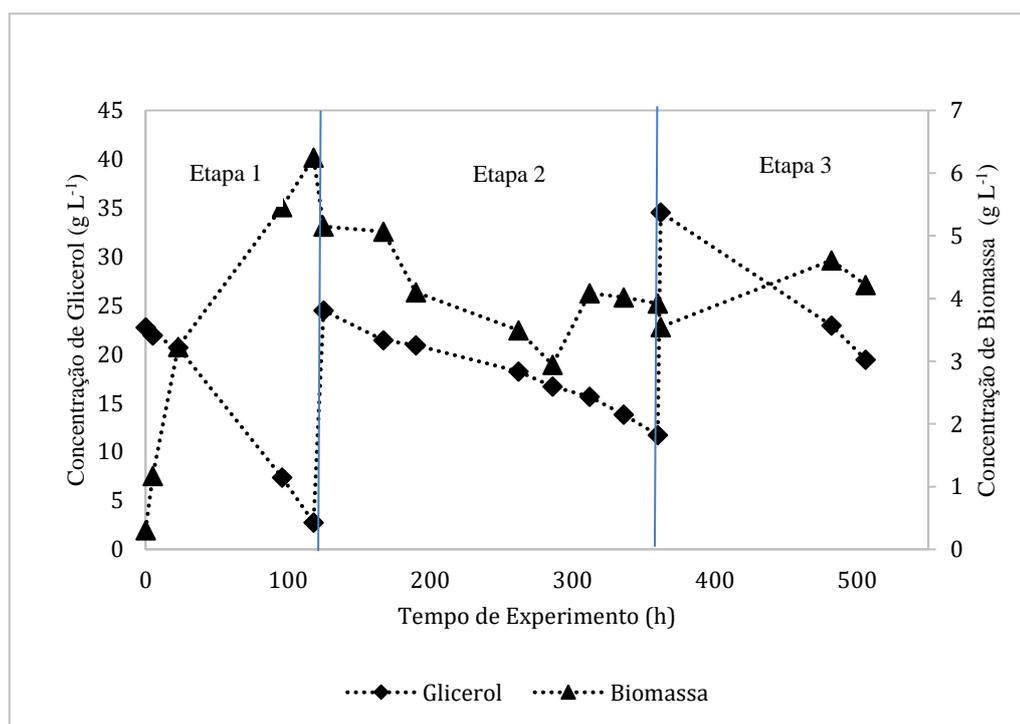


Figura 14. Experimento 2 - Gráfico de crescimento de Biomassa e Consumo de Glicerol para o frasco controle

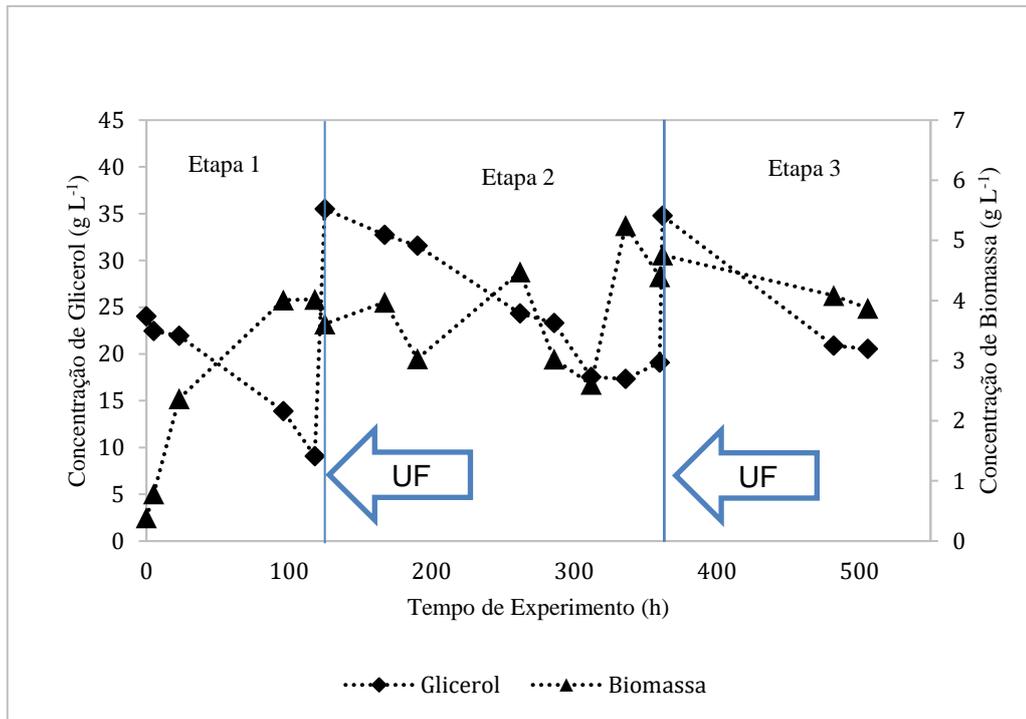


Figura 15 Experimento 2 - Gráfico de crescimento de Biomassa e Consumo de Glicerol para o frasco ultrafiltrado.

Cabe ressaltar que, assim como no experimento anterior, apenas ao frasco ultrafiltrado foi realizado o procedimento de ultrafiltração. Ao frasco controle um módulo foi inserido para imitação das condições de cultivo, porém sem a realização da UF. Ambos os frascos foram alimentados nos mesmos momentos. Analisando as figuras 14 e 15 observa-se que o frasco controle apresentou uma maior produção de biomassa que o frasco ultrafiltrado, obtendo um pico de crescimento de 6,2 g na hora 118, já o frasco ultrafiltrado teve seu pico apenas na hora 336, obtendo 5,2g de biomassa. Mais uma vez a presença do módulo de ultrafiltração durante o procedimento afetou a aeração ocasionando essa diferença entre frascos.

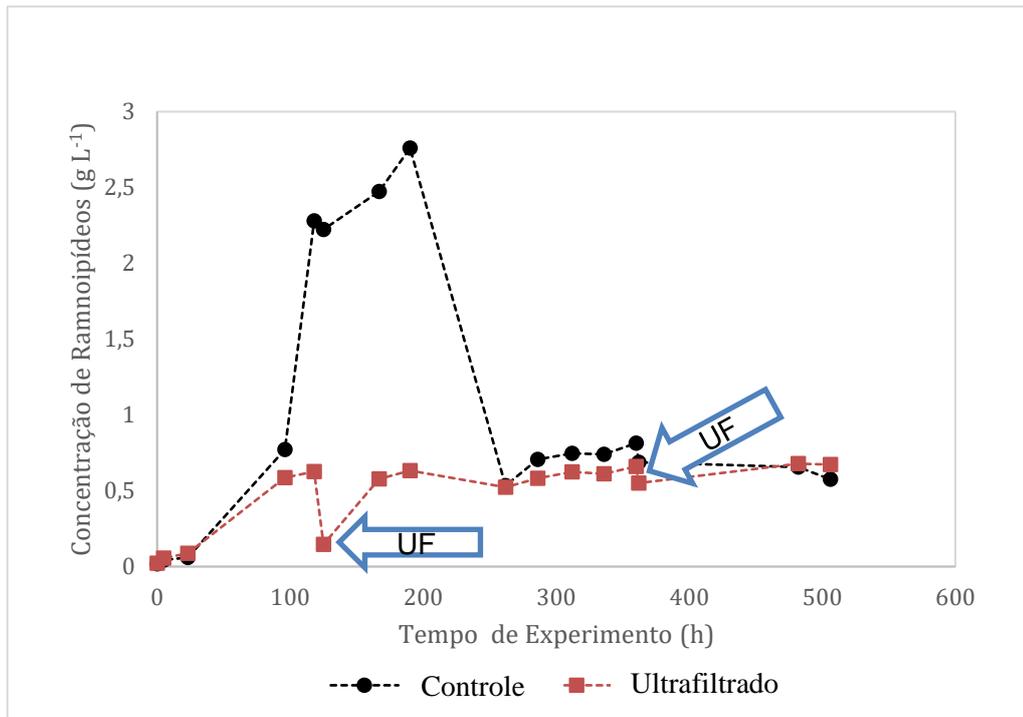


Figura 16. Experimento 2 – Comparação da produção de ramnolipídeos dos frasco controle e ultrafiltrado

Avaliando a produção de ramnolipídeos (figura 16) nota-se que a produção no frasco controle foi muito superior à do frasco ultrafiltrado até a hora 190. Isso é justificado pelo maior crescimento celular obtido no frasco controle  $6,2 \text{ g L}^{-1}$  frente a  $4,0 \text{ g L}^{-1}$  do frasco ultrafiltrado.

Visando ter mais clareza em relação a produtividade e ao  $Y_p/s$  do processo o experimento foi dividido em 3 etapas: do início do experimento até o tempo equivalente primeira ultrafiltração; do ponto imediatamente posterior a alimentação à segunda ultrafiltração; do ponto imediatamente posterior a segunda alimentação à finalização do experimento.

Dado os valores de produtividade volumétrica e fator de conversão produto em substrato, nota-se na tabela 6, que a produção do frasco controle só ocorreu até aproximadamente 118h. Em relação ao frasco ultrafiltrado pode-se pontuar que a produtividade caiu cerca de 57% da primeira para a segunda etapa e cerca de 60% da segunda para a terceira etapa, enquanto o fator de conversão caiu cerca de 23% da primeira para a segunda etapa e 74% da segunda para a terceira etapa.

Tabela 6. Experimento 2 – Resultados de produtividade volumétrica e Yp/s

Etapa	Intervalo (h)	Horas	Frasco controle		Frasco ultrafiltrado	
			Pp (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Yp/s (gg <sup>-1</sup> )	Pp (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Yp/s (gg <sup>-1</sup> )
1	0 -118	118	19,2	0,11	5,1	0,04
2	125 - 360	235	-6,0	-0,11	2,2	0,03
3	362 - 506	144	-1,6	-0,01	0,9	0,01

Observou-se ainda que após a alimentação, o frasco controle continuou produzindo até aproximadamente a hora 190, mas em seguida decaiu significativamente a sua concentração até a hora 506. Sodagari e Ju (2019) também reportaram a parada de produção de ramnolipídeos após 190h de fermentação com limitação de nitrogênio. Os ramnolipídeos podem ter sido consumidos visto que é possível que alguns biossurfactantes sejam produzidos como reserva externa de carbono. (Inoh *et al.*, 2004)

Em relação ao frasco ultrafiltrado, onde foi realizada a ultrafiltração, nota-se que no dia seguinte aos procedimentos de ultrafiltração/alimentação houve uma rápida reposição do produto que foi retirado, no entanto, essa produção também parou após 190h de experimento.

Assim como no primeiro experimento o frasco ultrafiltrado alcançou uma concentração final superior ao frasco controle. No entanto, devido ao comportamento anormal ocorrido entre as horas 118 e 190, outros experimentos foram conduzidos visando aprimorar a metodologia experimental.

No terceiro ensaio algumas ações foram modificadas com o objetivo de otimizar a produção de ramnolipídeos. Como observado nos experimentos anteriores, iniciar o experimento com o módulo de ultrafiltração dentro do frasco ocasionou intensa formação de espuma, por isso, foi decidido que os módulos seriam inseridos nos frascos apenas no momento da ultrafiltração, e retirados logo em seguida. Além disso, os módulos foram padronizados quanto a dimensões e conexões, para que as condições de cultivo fossem as mais próximas possíveis. Essas mudanças de metodologia eliminaram os problemas de formação de espuma durante o experimento e não aconteceram problemas de contaminação.

Outra mudança de procedimento adotada foi a realização da ultrafiltração/alimentação após 48h de experimento. De acordo com a literatura, a produção de ramnolípídeos por *Pseudomonas aeruginosa* não é associada ao crescimento, iniciando ao final da fase exponencial e início da fase estacionária (Tavares, 2007; Kronemberger, 2007). No entanto, observa-se que após 48h de experimento o consumo de substrato era de 1/3 a 1/2 da quantidade inicial. Neste contexto, a estratégia de alimentação também foi modificada visando analisar se a disponibilidade da fonte de carbono contribuiria com o aumento da produção. A alimentação foi então planejada para restaurar a concentração inicial de 30g L<sup>-1</sup> após 48h de experimento. Como nem sempre era possível avaliar a concentração de substrato dia após dia foi padronizado uma alimentação de 20 g L<sup>-1</sup> de glicerol por frasco.

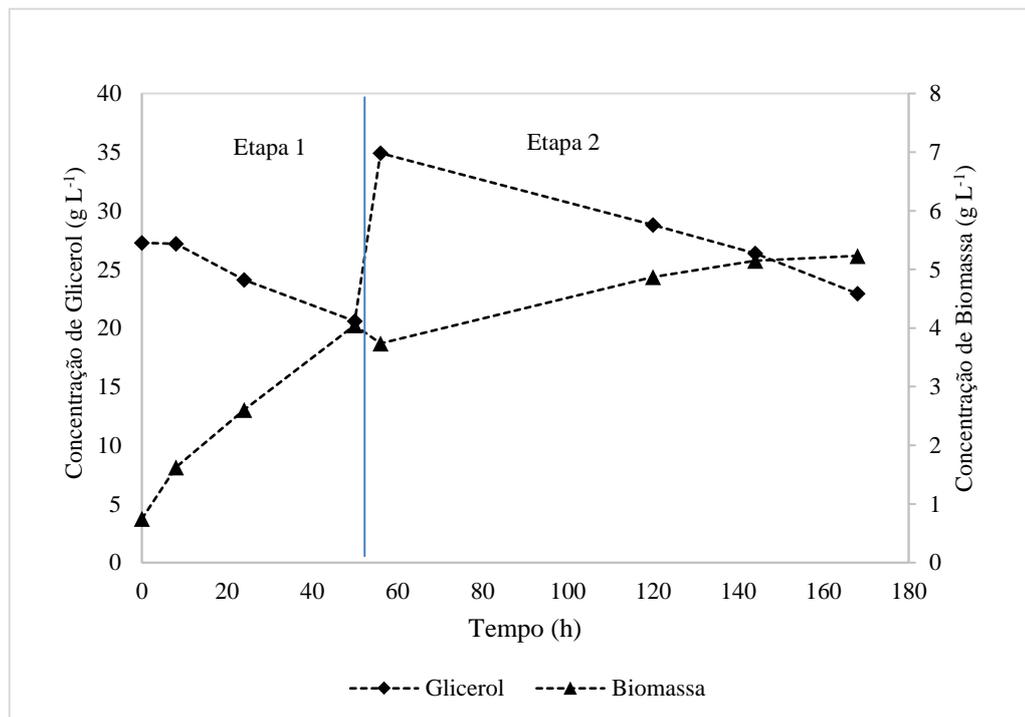


Figura 17. Experimento 3 - Gráfico de crescimento de Biomassa e Consumo de Glicerol para o frasco controle

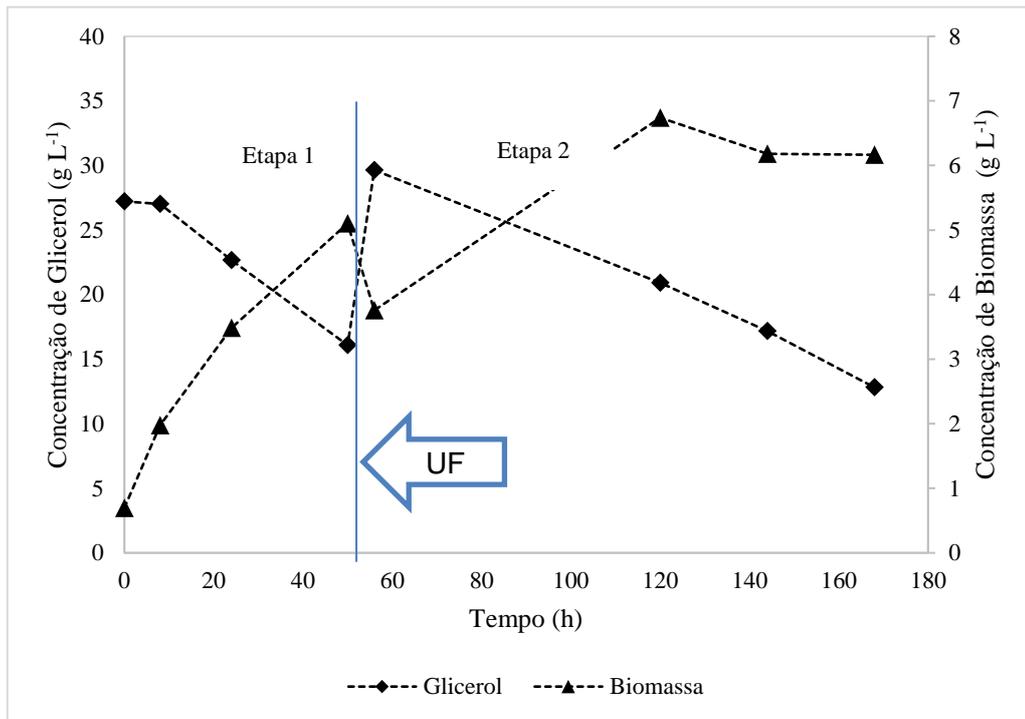


Figura 18. Experimento 3 - Gráfico de crescimento de Biomassa e Consumo de Glicerol para o frasco ultrafiltrado.

De maneira semelhante aos experimentos anteriores, no experimento 3 apenas ao frasco ultrafiltrado ocorreu ultrafiltração. No frasco controle, o módulo de ultrafiltração era inserido durante o período de ultrafiltração do frasco UF, apenas para produzir uma condição de cultivo similar, visto que este frasco era um frasco controle. Os dois frascos foram alimentados no mesmo momento. Nota-se que neste experimento o comportamento dos frascos, diferentemente dos experimentos anteriores foi muito parecido, o que era esperado com a retirada dos módulos de ultrafiltração e a padronização de ambos. A produção de biomassa, no entanto, divergiu um pouco em ambos os frascos, tendo o frasco ultrafiltrado aproximadamente 1g de biomassa a mais que o frasco controle na hora 50h.

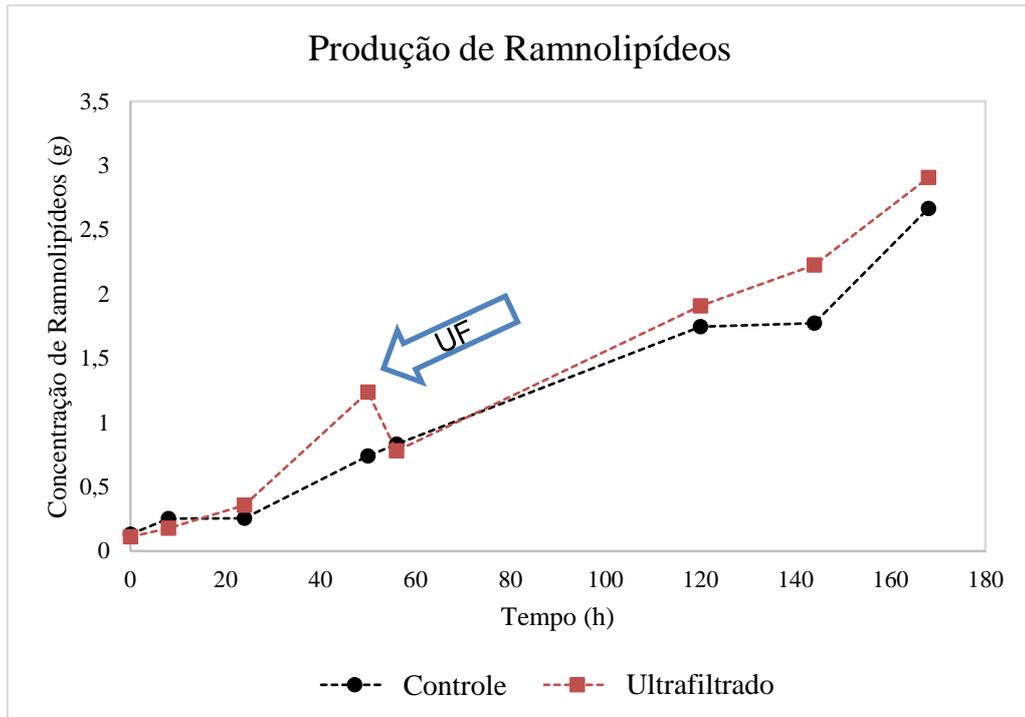


Figura 19. Experimento 3 – Comparação da produção de ramnolipídeos dos frasco controle e ultrafiltrado

Avaliando a figura 19 mais uma vez observa-se a correlação entre quantidade de biomassa e produção de ramnolipídeos. Em 50h a curva de crescimento de concentração de ramnolipídeos do frasco ultrafiltrado começa a se afastar da curva do frasco controle, no entanto após a ultrafiltração as produções se aproximaram novamente. Apenas após a hora 120 que a produção no frasco ultrafiltrado ultrapassa novamente a produção do frasco controle, o que corresponde ao pico de crescimento de biomassa de 6,7 g no frasco controle frente a 4,9 g no frasco ultrafiltrado como mostra a figura 18.

Nota-se que após imediatamente após a ultrafiltração, ocorre uma pequena redução da concentração de ramnolipídeos devido a retirada de produto e da diluição decorrida pela reposição do meio de cultivo. No entanto, chama a atenção neste caso que a produtividade não é retomada ao mesmo patamar que estava anteriormente, mas continua a crescer linearmente.

Assim como nos experimentos anteriores, para compreender melhor as características deste processo, a produtividade e o  $Y_p/s$  do processo foram avaliadas em duas etapas distintas, a primeira avaliando o intervalo do início do experimento e a primeira ultrafiltração, e a segunda a partir da alimentação até a finalização do experimento como é apresentado na tabela 7.

Tabela 7. Experimento 3 – Resultados de produtividade volumétrica e  $Y_p/s$ 

Etapa	Intervalo (h)	Horas	Frasco controle		Frasco ultrafiltrado	
			Pp ( $\text{mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	$Y_p/s$ ( $\text{gg}^{-1}$ )	Pp ( $\text{mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	$Y_p/s$ ( $\text{gg}^{-1}$ )
1	0 - 50	50	12,2	0,04	22,5	0,05
2	56 - 168	112	16,4	0,16	18,9	0,13

Nota-se que neste ensaio, houve uma retomada da produtividade de ambos os frascos e o fator de conversão de substrato em produto de ambos os frascos foi superior na segunda etapa em relação a primeira.

Em relação a massa obtida ao final do experimento ambos os frascos produziram mais de 1,3 g de ramnolipídeos, um valor aproximadamente o dobro do obtido no experimento 1 (0,4 g  $\text{L}^{-1}$  no frasco controle e 0,6 g  $\text{L}^{-1}$  no frasco ultrafiltrado) e o triplo do obtido no experimento 2 (0,3 g  $\text{L}^{-1}$  no frasco controle e 0,4 g  $\text{L}^{-1}$  no frasco ultrafiltrado). Dessa forma, a metodologia utilizada no experimento 3 foi a escolhida para o próximo experimento. Infelizmente os frascos foram descartados no laboratório acidentalmente o que impediu a avaliar se a produção continuaria com este ritmo.

O experimento 4 teve como objetivo avaliar se a adição de nitrogênio no segundo momento de alimentação modificaria o metabolismo celular promovendo um novo crescimento exponencial. Este experimento foi conduzido de igual maneira ao experimento 3, com os módulos padronizados inseridos apenas no momento da ultrafiltração, ressaltando que no frasco controle o módulo foi inserido apenas para replicar as mesmas condições do frasco ultrafiltrado, porém sem que fosse feita a ultrafiltração. No entanto foram realizadas duas alimentações uma após 48h de experimento para reposição da fonte de carbono e uma segunda alimentação após 220 horas com reposição de fonte de carbono e nitrogênio. Este experimento foi conduzido em duplicata.

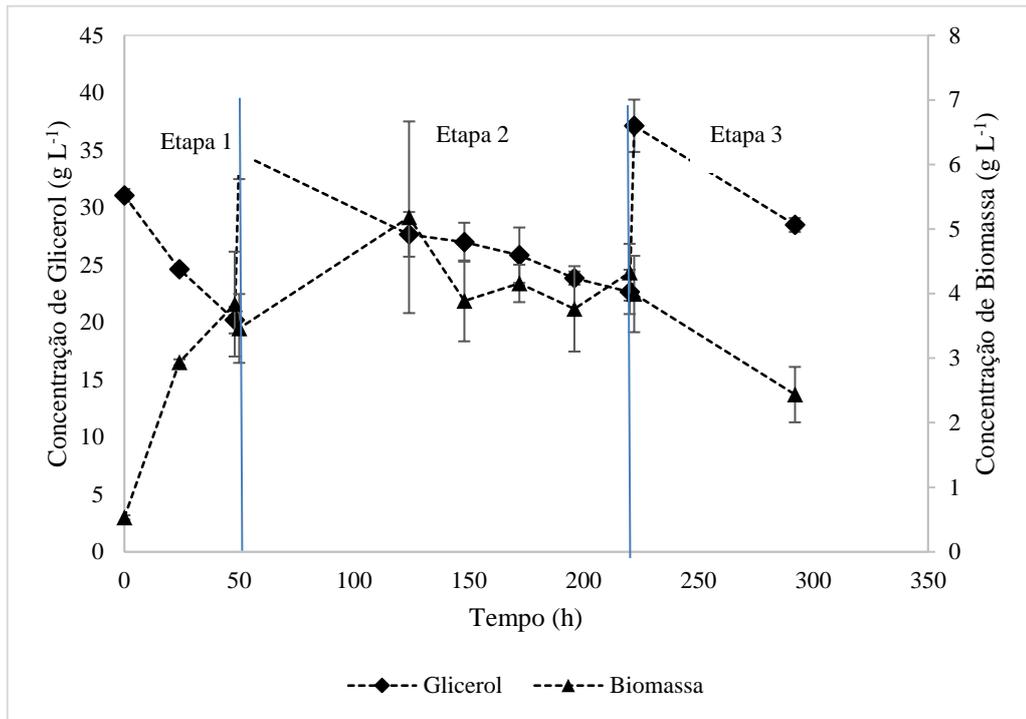


Figura 20. Experimento 4 - Gráfico de crescimento de Biomassa e Consumo de Glicerol para o frasco controle

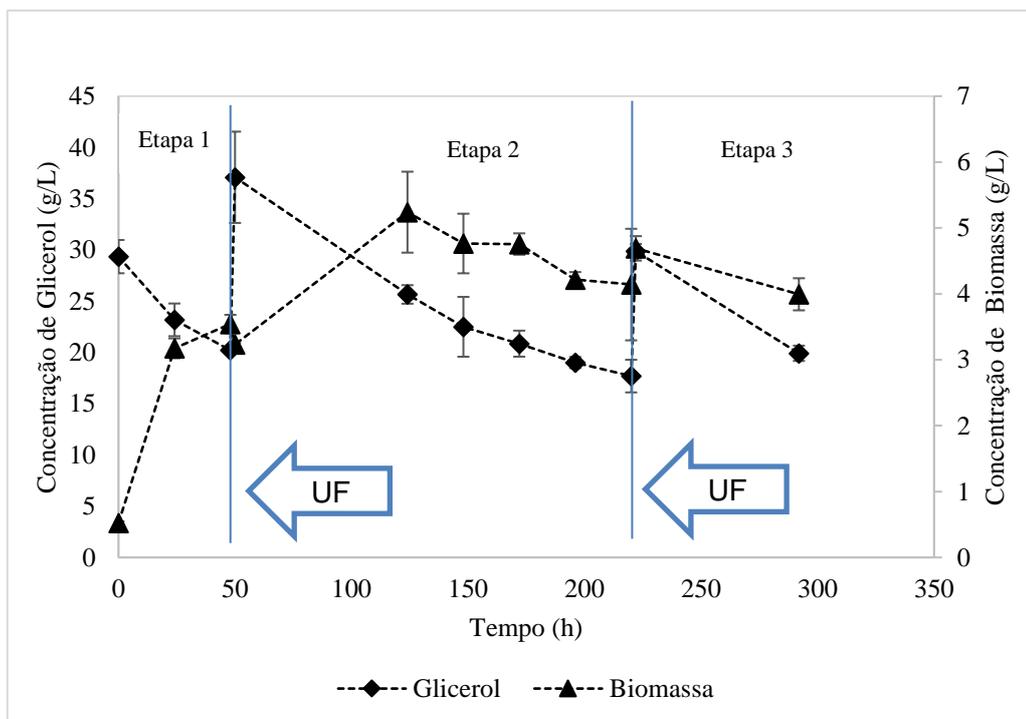


Figura 21. Experimento 4 - Gráfico de crescimento de Biomassa e Consumo de Glicerol para o frasco ultrafiltrado.

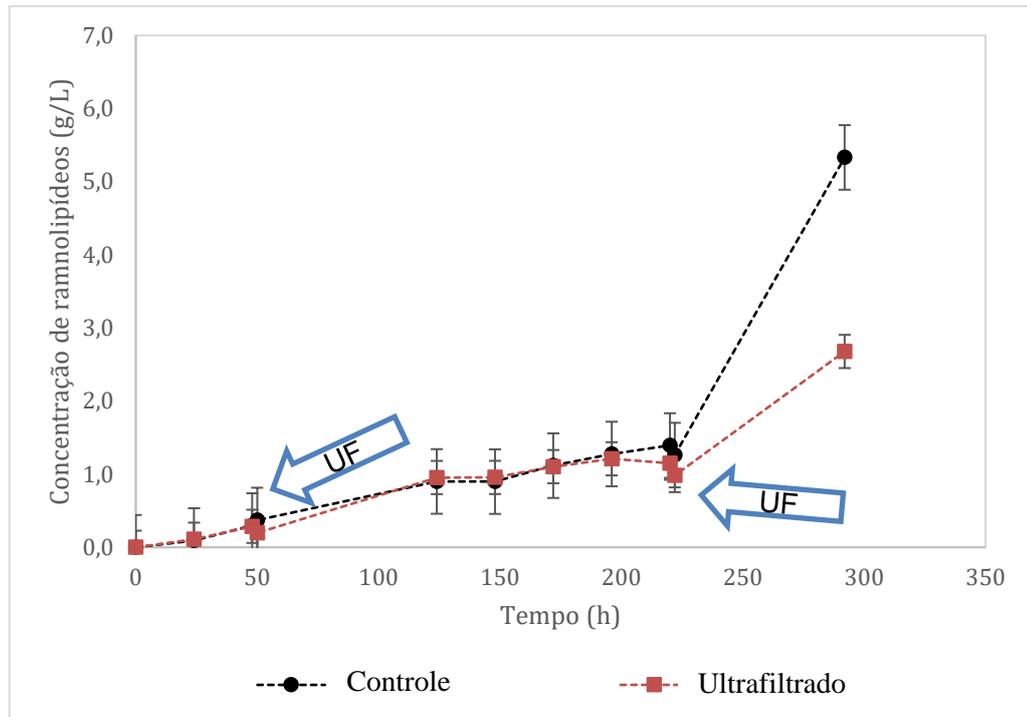


Figura 22. Experimento 4 – Comparação da produção de ramnolipídeos dos frasco controle e ultrafiltrado

Observa-se na figura 22 que ambos os frascos apresentaram a partir da hora 190 uma concentração de ramnolipídeos praticamente constante até a hora 220, quando foi realizada a alimentação com nitrogênio. A reposição de nitrogênio foi de 2,6 g de  $\text{NO}_3^-$ , o equivalente a uma razão C/N de aproximadamente 6/1 no frasco após a alimentação. Avaliando a produtividade volumétrica e os fatores de conversão nas três etapas experimentais (tabela 8), observa-se o salto de produtividade na terceira etapa para o frasco controle e para o frasco ultrafiltrado após a alimentação com nitrogênio.

Tabela 8. Experimento 4 – Resultados de produtividade volumétrica e  $Y_p/s$

Etapa	Intervalo (h)	Horas	Frasco controle		Frasco ultrafiltrado	
			$P_p$ ( $\text{mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	$Y_p/s$ ( $\text{gg}^{-1}$ )	$P_p$ ( $\text{mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	$Y_p/s$ ( $\text{gg}^{-1}$ )
1	0 - 48	48	6,2	0,03	6,0	0,03
2	50 - 220	170	6,0	0,08	5,6	0,05
3	222 - 292	70	57,1	0,47	24,2	0,17

Cabe pontuar que, observando as figuras 20 e 21 a adição de nitrogênio não fez com que as células voltassem a crescer, pelo contrário observou-se uma redução na concentração da biomassa. Também foi observado o aparecimento da coloração castanha no meio de cultivo, diferente do amarelo característico, como é possível observar na figura 23. Tavares (2007) reportou o mesmo comportamento em um de seus experimentos e afirmou que uma das hipóteses para este acontecimento é a produção de metabólitos relacionados direta e indiretamente com a via de biossíntese dos ramnolipídeos, como o alginato e o polihidroxicanoato .



Figura 23. A) Frascos agitados antes da reposição de nitrogênio. B) Frascos agitados após reposição de nitrogênio.

Tabela 9. Resumo dos parâmetros de fermentação de todos os experimentos ao final da fermentação.

	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3		Experimento 4	
	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2
<b>Pp<sub>v</sub> (mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>)</b>	2,4	2,9	1,1	1,3	15,9	17,3	18,3	9,2
<b>Pp<sub>m</sub> (mg h<sup>-1</sup>)</b>	1,2	1,7	0,5	0,8	8,2	8,9	9,1	4,6
<b>X<sub>máx</sub> (g)</b>	3,4	2,7	6,2	5,2	6,7	5,2	5,2	5,2
<b>RML final (g)</b>	0,4	0,6	0,3	0,4	1,4	1,5	2,7	1,3
<b>RML final (g L<sup>-1</sup>)</b>	0,8	1,0	0,6	0,7	2,7	2,9	5,3	2,7
<b>Horas totais</b>	336		506		168		292	

Analisando a tabela 9, nota-se que a produção de ramnolipídeos foi superior para os experimentos 3 e 4, os quais a alimentação foi realizada após 48h do início da fermentação. Também é observado que a alimentação com nitrogênio no experimento 4 contribuiu para o maior resultado de concentração de ramnolipídeos, 5,3 g L<sup>-1</sup>.

Após avaliação de todos os experimentos infere-se que em longos períodos de limitação de nitrogênio existe uma parada ou redução de produtividade volumétrica nas fermentações, como também observado por Sodagari e Ju (2019)

Além disso, não é possível afirmar que a retirada de ramnolipídeos foi um fator que contribuiu com o aumento da produtividade da fermentação, tendo em vista que em algumas fermentações as etapas posteriores a ultrafiltração obtiveram uma produtividade volumétrica maior e em outras não. Desta forma, a partir deste trabalho não é possível afirmar a hipótese de que a presença de ramnolipídeos é um fator limitante para a produtividade da fermentação.

Outro fato a se considerar é que nos experimentos 3 e 4, que foram realizados sem a presença do módulo de filtração como agitador, a produção de ramnolipídeos nos frascos controle foi superior ao frasco ultrafiltrado, indicando que o oxigênio empregado no experimento é um fator importante para a produção deste metabólito.

Cabe destacar que a hipótese de inibição por produto foi rejeitada por Sodagari e Ju (2019) tendo em vista que a inibição da produção de ramnolipídeos aconteceu em concentrações diversas de ramnolipídeos  $21 \text{ g L}^{-1}$ ,  $41 \text{ g L}^{-1}$  e  $62 \text{ g L}^{-1}$ , muito superiores as concentrações obtidas neste estudo, o que corrobora com a primeira hipótese de que para ramnolipídeos, o fator crucial para a queda de produção é a limitação excessiva de nitrogênio.

Soberón-Chavez *et al.* (2005) afirmam que, na verdade, condições limitantes de nitrogênio não favorecem a produção de ramnolipídeos por si, mas são fundamentais para o início da produção, que inicia após o período de crescimento exponencial quando ocorre a exaustão de nitrogênio. E, de acordo com Tavares (2007), que produção de ramnolipídeos é inibida pela presença de  $\text{NH}_4^+$ , glutamina, asparagina, e arginina como fontes de nitrogênio, mas é promovida pela adição de  $\text{NO}_3^-$ , glutamato e aspartato em batelada alimentada.

### **Avaliação da Ultrafiltração para recuperação de ramnolipídeos**

Para melhor compreensão deste tópico, os procedimentos e parâmetros de ultrafiltração serão avaliados por experimento. A ultrafiltração foi realizada sempre anteriormente à

alimentação suplementar e, em alguns experimentos, foram realizadas ultrafiltrações ao final do experimento para contribuir com a avaliação da eficiência de recuperação do produto.

O principal objetivo do acoplamento do sistema de ultrafiltração para os ensaios realizados era de recuperar um permeado rico em biossurfactante e livre de células – a purificação do permeado quanto ao teor de ramnolipídeos não foi avaliada.



Figura 24. Permeado recolhido na ultrafiltração

Em todas as ultrafiltrações esse objetivo foi atingido, de modo que se obteve como o permeado um líquido transparente com a coloração amarelada, como apresentado na figura 24. A tabela 18 apresenta os resultados das filtrações realizadas nos 4 experimentos discutidos na seção anterior.

Uma grande dificuldade nos experimentos realizados foi a otimização do sistema de ultrafiltração. Foram necessárias muitas conexões na montagem do sistema, e estas conexões eram adaptadas de tubos de silicone de diferentes diâmetros, tendo em vista que os módulos foram construídos no laboratório.

O uso destas conexões favoreceu a entrada de ar no sistema o que impossibilitava um acompanhamento preciso do fluxo de permeado à medida que o volume de meio era filtrado.

Além disso, foram necessárias várias reduções de diâmetro desde o módulo até o tubo principal do sistema e expansão do diâmetro do tubo até a entrada da bomba. Esses acidentes também contribuíram com o aumento da perda de carga do sistema e redução do fluxo. Dessa forma, não foi possível avaliar os efeitos resistivos que limitam o fluxo de permeação devido a estas interferências operacionais.

Avaliando a tabela 10, é importante pontuar que a permeabilidade da membrana não apresentou uma relação direta com a eficiência da recuperação do produto no processo de ultrafiltração. Como foi observado por Isa & Jauregi (2008) a seletividade da separação não pode ser explicada apenas com base na permeabilidade da membrana, visto que as interações eletrostáticas entre o surfactante e as membranas exercem uma influência significativa no desempenho da separação do surfactante.

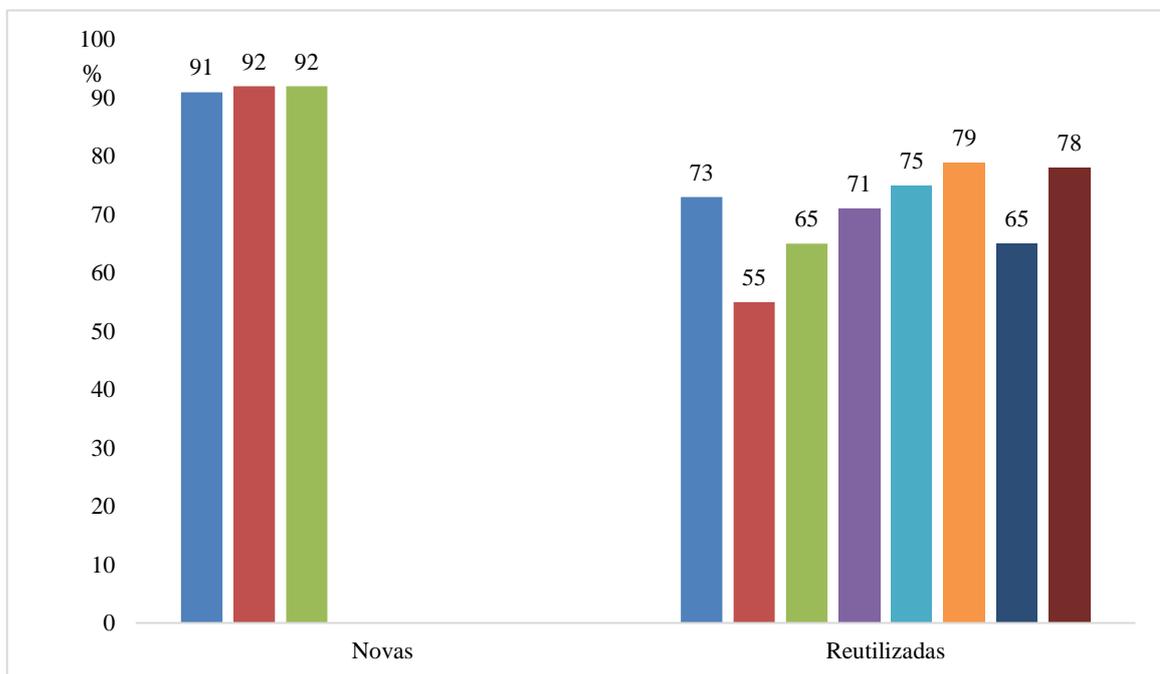


Figura 25. Comparação entre eficiência de recuperação entre módulos novos e reutilizados.

Também cabe destacar que durante o experimento os módulos eram reutilizados nas ultrafiltrações e somente substituídos em caso de quebra das fibras. Como pode ser observado na figura 25, quando a ultrafiltração era realizada com módulos novos, a eficiência de recuperação de produto era superior a 90%, e após lavagem esse valor caía para faixas entre 55 e 79%.

Podem ocorrer alterações na membrana devido a processos reversíveis e/ou irreversíveis, predominantemente desencadeados por mecanismos como bloqueio de poros, adsorção, reações químicas e deposição de partículas na superfície da membrana e/ou em seus poros (Oliveira, 2021).

Analisando as especificações da membrana, quanto ao tamanho dos poros (0,03 – 0,05  $\mu\text{m}$ ) os ramnolipídeos não deveriam ficar retidos por exclusão por tamanho visto que suas moléculas variam de 1-10 nm (Silva, 2016). No entanto, como avaliado por Haba *et al.* (2014) e Silva (2016), é uma característica dos ramnolipídeos se organizarem em estruturas micelares que tendem a aumentar com o aumento da concentração, podendo alcançar de 80 a 1000nm. As concentrações obtidas de ramnolipídeos nos experimentos realizados (0,6 a 5,3  $\text{g L}^{-1}$ ) são superiores a CMC média dos biossurfactantes (10 – 200  $\text{mg L}^{-1}$ ) descrita por Christofi & Ivshina, 2016, neste sentido, a formação de micelas pode ter contribuído para a redução da eficiência de separação visto que o tamanho dessas estruturas pode ser superior aos poros da membrana utilizada.

Outro fator que pode ser considerado é a adsorção do biossurfactante às membranas. Giro Maitam *et al.* (2022) avaliaram a interação dos ramnolipídeos em membranas de UF e mostraram uma alta estabilidade da adsorção de ramnolipídios na superfície das membranas. De modo semelhante, neste trabalho uma parte dos ramnolipídeos pode ter sido adsorvida pelas fibras do módulo de ultrafiltração o que pode ter contribuído para a redução de concentração do permeado principalmente em membranas reutilizadas. Nota-se que devido a estabilidade da interação ramnolipídeo-membrana, o processo de lavagem empregado pode não ter sido suficiente para restaurar as condições iniciais para altas eficiências de recuperação de produto.

Tabela 10. Dados de Ultrafiltração

	Tempo (h)	Pressão (bar)	Vazão (L h <sup>-1</sup> )	Fluxo (L m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	Permeabilidade (L m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> bar)	Concentrado (g L <sup>-1</sup> )	Permeado (g L <sup>-1</sup> )	Eficiência da UF (%)
Exp. 1 UF1*	1,2	0,1	0,1	1,8	18,4	0,9	0,8	91
Exp. 1 UFinal	0,4	0,5	0,2	5,7	11,4	1,0	0,7	73
Exp. 2 UF1*	0,5	0,3	0,2	4,7	15,7	0,6	0,6	92
Exp. 2 UF2	0,6	0,3	0,2	4,0	13,4	0,6	0,4	55
Exp. 2 UFinal	0,8	0,3	0,1	2,7	9,1	0,7	0,4	65
Exp. 3 UF1	0,2	0,5	0,4	9,0	18,0	0,7	0,5	71
Exp. 3 UFinal	0,6	0,3	0,2	3,9	12,9	3,3	2,5	75
Exp. 4 UF1	0,3	0,5	0,3	7,0	14,0	0,3	0,3	79
Exp. 4 UF1 – duplicata	0,4	0,4	0,3	5,9	14,8	1,3	0,8	65
Exp. 4 UF2 *	0,3	0,5	0,3	7,5	15,0	0,2	0,2	92
Exp. 4 UF2 –duplicata	0,3	0,4	0,3	7,4	18,5	1,0	0,8	78

\*Módulos novos

## 6. Conclusão

A partir experimentos conduzidos neste trabalho foi possível observar que a produção de ramnolipídeos em limitação de nitrogênio funciona até 190h de experimento o que corresponde a aproximadamente 8 dias de fermentação. Ademais, também foi observado que a reposição deste nutriente reativou a produção dos ramnolipídeos e que a reposição de fonte de carbono após 48h de fermentação contribuiu para o aumento da produção do biossurfactante. Dessa forma, são necessários estudos posteriores que avaliem outras metodologias de alimentação que explorem a reposição de nitrogênio após 190h e bem como reposição de fonte de carbono.

Não foi possível afirmar a partir dos experimentos o efeito da inibição por produto dos ramnolipídeos devido as baixas concentrações de biossurfactante alcançadas neste trabalho, de modo que não foi observado que a retirada do produto ocasionava aumento da produtividade. Cabe destacar, no entanto, que a retirada de produto não afetou negativamente a produtividade pois após a retirada o biossurfactante era rapidamente produzido e a concentração do produto para retornava a um valor semelhante ao existente antes da ultrafiltração. Com isso, conclui-se que é possível realizar uma retirada semi-contínua de produto.

O entendimento do metabolismo envolvido na produção dos ramnolipídeos ainda não foi completamente esgotado, ainda existem oportunidades de otimização da produção desse bioproduto quanto aos parâmetros operacionais envolvidos na fermentação em processos de batelada e semi-contínuos e seu escalonamento para o nível industrial.

A ultrafiltração se mostrou uma tecnologia viável para recuperação de ramnolipídeos, filtrando toda a biomassa alcançando eficiência de recuperação de ramnolipídeos de >90% para membranas novas e >55% para membranas limpas. São necessários estudos posteriores que aprofundem o conhecimento a respeito das interações entre biossurfactantes e membranas para que o fluxo e a permeabilidade destas filtrações sejam aprimorados, bem como metodologias de limpeza. Neste sentido a adoção de retrolavagem pode ser um mecanismo eficiente para recuperar as membranas e aumentar a eficiência do processo.

Por fim, neste trabalho pode-se observar que o acoplamento de membranas de UF para remoção submersa do produto purificado, combinado à adoção de estratégias de alimentação suplementar, é uma metodologia viável para aumentar a produtividade operacional da produção de ramnolipídeos tendo em vista que reduz o tempo de inatividade e trabalho para limpeza e reabastecimento do reator e possibilita uma retirada semi-contínua do produto.

Neste sentido, espera-se que o aprimoramento de metodologias que utilizem processos de separação por membrana para recuperação de biossurfactantes contribua com o escalonamento, redução do custo de produção e aumento da competitividade desse bioproduto frente aos surfactantes sintéticos possibilitando a sua utilização na indústria de Óleo e Gás e demais.

## 7. Referências

1. Alvarez, V. M. *et al.*, *Bacillus amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, v. 136, p. 14–21, 2015
2. Almeida, Karen Lopes. Produção de rhamnolipídios por isolados de *Pseudomonas*: avaliação do efeito das fontes de carbono e nitrogênio na composição do rhamnolipídio. 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. doi:10.11606/D.42.2012.tde-25052012-095221.
3. Amaral, R. A. Remoção de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>S do Gás Natural por Contactores com Membranas. 104 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). COPPE/ Programa de Engenharia Química. UFRJ. Rio de Janeiro. 2009.
4. Assis, I. P. Downstream de biomoléculas de alto valor agregado: Enzimas amilolíticas e antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. 46 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Escola de Engenharia de Lorena, USP, Lorena, 2014. Disponível em: <https://sistemas.eel.usp.br/bibliotecas/monografias/2014/MBI14021.pdf>.
5. Banat, I. M. *et al.*, Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 87, n. 2, p. 427–444, 2010.
6. Benincasa, M.; Marqués, A.; Pinazo, A.; Manresa, A. Rhamnolipid Surfactants: Alternative Substrates, New Strategies. In: SEN, R. (Ed.). *Biosurfactants. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 672. Springer, New York, NY, 2010. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_13)
7. Blunt, W.; Blanchard, C.; Morley, K. Effects of environmental parameters on microbial rhamnolipid biosynthesis and bioreactor strategies for enhanced productivity. *Biochemical engineering journal*, v. 182, n. 108436, p. 108436, 2022.
8. Braga Junior, W.B. Recuperação de Hidrocarbonetos Voláteis de correntes gasosas por Permeação de Vapor. 107 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). COPPE. UFRJ. Rio de Janeiro. 2007
9. Carolin, C. F. *et al.*, Sustainable production of biosurfactants via valorisation of industrial wastes as alternate feedstocks. *Chemosphere*, v. 312, n. Pt 1, p. 137326, 2023.
10. Chen, C. *et al.*, Enhanced biosurfactant production in a continuous fermentation coupled with in situ foam separation. *Genie des procedes [Chemical engineering and processing]*, v. 159, n. 108206, p. 108206, 2021.

11. Chen, H.-L.; Chen, Y.-S.; Juang, R.-S. Separation of surfactin from fermentation broths by acid precipitation and two-stage dead-end ultrafiltration processes. *Journal of membrane science*, v. 299, n. 1–2, p. 114–121, 2007.
12. Coutte, F. *et al.*, New integrated bioprocess for the continuous production, extraction and purification of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in membrane bioreactor. *Process biochemistry* (Barking, London, England), v. 48, n. 1, p. 25–32, 2013.
13. Christofi, N.; Ivshina, I. Microbial surfactants and their use in soil remediation. In: *Bioremediation of Aquatic and Terrestrial Ecosystems*. [s.l.] CRC Press, 2016. p. 311–327.
14. Dabaghi, S.; Ataei, S. A.; Taheri, A. Production of rhamnolipid biosurfactants in solid-state fermentation: process optimization and characterization studies. *BMC biotechnology*, v. 23, n. 1, 2023.
15. Daltin, Decio. *Tensoativos: química, propriedades e aplicações* – São Paulo: Blucher, 2011. ISBN 978-85-212-0585-2
16. Dave, N.; Joshi, T. A concise review on surfactants and its significance. *International journal of applied chemistry*, v. 13, n. 3, p. 663–672, 2017.
17. Das, A. J.; Kumar, R. Utilization of agro-industrial waste for biosurfactant production under submerged fermentation and its application in oil recovery from sand matrix. *Bioresource technology*, v. 260, p. 233–240, 2018.
18. De Andrade, C. J. *et al.*, Ultrafiltration based purification strategies for surfactin produced by *Bacillus subtilis* LB5A using cassava wastewater as substrate. *Journal of chemical technology and biotechnology* (Oxford, Oxfordshire: 1986), v. 91, n. 12, p. 3018–3027, 2016.
19. De Mélo, Beatriz Cavalcanti Amorim *Produção de Celulases por Fermentação em Estado Sólido em Resíduo de Acerola (Malpighia sp.) Utilizando Trichoderma reesei*. 116 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Centro Tecnológico/Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos. UFSC. Florianópolis. 2016.
20. De Oliveira Schmidt, V. K. *et al.*, Biosurfactant inducers for enhanced production of surfactin and rhamnolipids: an overview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 37, n. 2, p. 21, 2021.
21. Dhariwal, A. *et al.*, Effect of emulsified feeding of oily substrate via submerged ceramic membranes on surfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* fermentation. *Bioprocess and biosystems engineering*, v. 31, n. 5, p. 401–409, 2008.
22. Dolman, B. M.; Wang, F.; Winterburn, J. B. Integrated production and separation of biosurfactants. *Process biochemistry* (Barking, London, England), v. 83, p. 1–8, 2019.
23. Dos Santos, I. B. A. *Panorama De Aplicação De Métodos Microbiológicos Como Recuperação Avançada De Petróleo No Brasil E No Mundo*. 2019. 42p. Trabalho De Conclusão De Curso (Graduação Em Engenharia De Petróleo) - Universidade Federal Do Rio Grande Do Norte Centro De Tecnologia, Natal - RN. Disponível em:

[https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/39476/2/Panoramadeaplica%C3%A7%C3%A3o\\_Santos\\_2019.pdf](https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/39476/2/Panoramadeaplica%C3%A7%C3%A3o_Santos_2019.pdf)

24. El-Housseiny, G. S. *et al.*, Rhamnolipid production by a gamma ray-induced *Pseudomonas aeruginosa* mutant under solid state fermentation. *AMB express*, v. 9, n. 1, 2019.
25. Eslami, P.; Hajfarajollah, H.; Bazsefidpar, S. Recent advancements in the production of rhamnolipid biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa*. *RSC advances*, v. 10, n. 56, p. 34014–34032, 2020.
26. Galvão, D. F.; Gomes, E. R. Dos S. Os Processos De Separação Por Membranas E Sua Utilização No Tratamento De Efluentes Industriais Da Indústria De Laticínios: Revisão Bibliográfica. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 70, n. 6, p. 349, 2015
27. Gaur, V. K. *et al.*, Production of biosurfactants from agro-industrial waste and waste cooking oil in a circular bioeconomy: An overview. *Bioresource technology*, v. 343, n. 126059, p. 126059, 2022.
28. Giri, S. S. *et al.*, Antioxidant, antibacterial, and anti-adhesive activities of biosurfactants isolated from *Bacillus* strains. *Microbial pathogenesis*, v. 132, p. 66–72, 2019.
29. Giro Maitam, M. V., Nicolini, J. V., & de Araujo Kronemberger, F. (2022). Anti-fouling performance of polyamide microfiltration membrane modified with surfactants. *Journal of Applied Polymer Science*, 139(42). <https://doi.org/10.1002/app.53015>
30. Gudiña, E. J. *et al.*, Valorization of agro-industrial wastes towards the production of rhamnolipids. *Bioresource technology*, v. 212, p. 144–150, 2016.
31. Gruber, T., Chmiel, H., Kappeli, O. *et al.*, “Integrated process for continuous rhamnolipid biosynthesis”. In: Kosaric, N. (ed), *Biosurfactants (Surfactants Science Series) 48*, chapter 5, pp. 157-173. 1993.
32. Haba, E., Pinazo, A., Pons, R., Pérez, L., & Manresa, A. (2014). Complex rhamnolipid mixture characterization and its influence on DPPC bilayer organization. *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1838(3), 776–783. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.11.004>
33. He, N. *et al.*, Toward high-efficiency production of biosurfactant rhamnolipids using sequential fed-batch fermentation based on a fill-and-draw strategy. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, v. 157, p. 317–324, 2017.
34. Habert, A.C.; Borges, C.P.; Nóbrega, E. *Processos de Separação por Membranas. Cap. 3. Caracterização de Membranas. COOPPE. UFRJ. 2006.*
35. Ibrahim, M. L. *et al.*, Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. *International biodeterioration & biodegradation*, v. 81, p. 28–34, 2013.

36. Isa, M. H. M., Frazier, R. A., & Jauregi, P. (2008). A further study of the recovery and purification of surfactin from fermentation broth by membrane filtration. *Separation and Purification Technology*, 64(2), 176–182. doi:10.1016/j.seppur.2008.09.008
37. Inès, M.; Dhouha, G. Glycolipid biosurfactants: Potential related biomedical and biotechnological applications. *Carbohydrate research*, v. 416, p. 59–69, 2015.
38. Inoh, Y., Kitamoto, D., Hirashima N., Nakashimni M. Biosurfactant MEL-A dramatically increase gene transfection via mebrane fusion. *J Control Release*. 2004. 94: 423-431.
39. Jahan, R.; Bodratti, A. M.; Tsianou, M. Alexandridis, P. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*. 275:102061. 2019. doi: 10.1016/j.cis.2019.102061
40. Jauregi, P.; Kourmentza, K. Membrane Filtration of Biosurfactants. In: *Separation of Functional Molecules in Food by Membrane Technology*. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 79–112.
41. Johnravindar, D. *et al.*, Bioreactor-scale production of rhamnolipids from food waste digestate and its recirculation into anaerobic digestion for enhanced process performance: Creating closed-loop integrated biorefinery framework. *Bioresource technology*, v. 360, n. 127578, p. 127578, 2022.
42. Jiang, J. *et al.*, Recent progress towards industrial rhamnolipids fermentation: process optimization and foam control, *Bioresource Technology*. *Bioresource Technology*, 2019.
43. Jimoh, A. A.; Lin, J. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 184, n. 109607, p. 109607, 2019.
44. Joshi, S. J.; Geetha, S. J.; Desai, A. J. Characterization and Application of Biosurfactant Produced by *Bacillus licheniformis* R2. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 177, n. 2, p. 346–361, 2015.
45. Joy, S. *et al.*, Statistical and sequential (fill-and-draw) approach to enhance rhamnolipid production using industrial lignocellulosic hydrolysate C6 stream from *Achromobacter* sp. (PS1). *Bioresource technology*, v. 288, n. 121494, p. 121494, 2019.
46. Júnior, Eduardo de Oliveira. Análise econômica preliminar da produção de biossurfactantes ramnolipídicos por *Pseudomonas aeruginosa* utilizando glicerina bruta como matéria-prima. 87p. (Projeto Final) -Escola de Química. UFRJ. Rio de Janeiro. 2022.
47. Kashif, A. *et al.*, Current advances in the classification, production, properties and applications of microbial biosurfactants - A critical review. *Advances in colloid and interface science*, v. 306, n. 102718, p. 102718, 2022.
48. Kronemberger, F. de A. Produção de Ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em Biorretor Com Oxigenação por Contactor de Membranas. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Programa de Engenharia Química. UFRJ. Rio de Janeiro. 2007.

49. Kumar, R.; DAS, A. J. Rhamnolipid biosurfactant: Recent trends in production and application. Singapore, Singapore: Springer, 2019.
50. Lee, K. M. *et al.*, Rhamnolipid production in batch and fed-batch fermentation using *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P. *Biotechnology and bioprocess engineering: BBE*, v. 9, n. 4, p. 267–273, 2004.
51. Li, Y. *et al.*, Exploring biosurfactants as a sustainable alternative to chemical surfactants. *Colloids and surfaces. A, Physicochemical and engineering aspects*, v. 677, n. 132291, p. 132291, 2023.
52. Lins, Igor Emanuel da Silva. Modelagem Da Tensão Interfacial Em Fluidos De Reservatório E Simulação Dos Seus Efeitos Na Recuperação Avançada De Petróleo Via Injeção De Dióxido De Carbono. 140 p. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial) - Universidade Federal da Bahia. Salvador. 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/handle/ri/33819>
53. Liu, H. *et al.*, Foliar penetration enhanced by biosurfactant rhamnolipid. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, v. 145, p. 548–554, 2016.
54. Liu, K. *et al.*, Rational design, properties, and applications of biosurfactants: a short review of recent advances. *Current opinion in colloid & interface science*, v. 45, p. 57–67, 2020.
55. Long, X. *et al.*, Two-step ultrafiltration of rhamnolipids using PSU-g-PEG membrane. *Journal of membrane science*, v. 409–410, p. 105–112, 2012.
56. Makkar, R. S.; Cameotra, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 58, n. 4, p. 428–434, 2002.
57. Marchant, R.; Banat, I. M. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnology letters*, v. 34, n. 9, p. 1597–1605, 2012.
58. Marinho, Patrícia Suzanne da Silva; SILVA, Renata Raianny da; LUNA, Juliana Moura de. Biosurfactantes microbianos e aplicações ambientais: uma revisão narrativa. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 12, e103111234123, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i12.34123>.
59. Moro, G. V. Obtenção e caracterização de biosurfactantes produzidos por microrganismos isolados de ambientes contaminados com petróleo para usos biotecnológicos. 120p. Tese (Doutorado em Ciências). Centro de Biotecnologia. Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul. Porto Alegre. 2018. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/187224>
60. Mulligan, C. N.; Gibbs, B. F. Recovery of biosurfactants by ultrafiltration. *Journal of chemical technology and biotechnology. Oxford*. v. 47. n. 1. p. 23–29. 1990.
61. Mulligan, C.N. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution, Oxford*, v.133, p.183-198, 2005.

62. Najmi, Z. *et al.*, In situ downstream strategies for cost-effective bio/surfactant recovery. *Biotechnology and applied biochemistry*, v. 65, n. 4, p. 523–532, 2018.
63. Nascimento, A. E. G do Estudo Da Molhabilidade De Superfícies De Parafina E Aço Inoxidável Por Soluções De Tensoativos Não Iônicos. 116 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia. UFRN. Natal-RN. 2015. Disponível em: [https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/20399/1/AndreEzequielGomesDoNascimento\\_TESE.pdf](https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/20399/1/AndreEzequielGomesDoNascimento_TESE.pdf)
64. Nitschke, M.; Pastore, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Quimica nova*, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.
65. Noh, N. A. M.; Salleh, S. M.; Yahya, A. R. M. Enhanced rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* USM-AR2 via fed-batch cultivation based on maximum substrate uptake rate. *Letters in applied microbiology*, v. 58, n. 6, p. 617–623, 2014.
66. Oliveira, Daimon Jefferson Jung de Estudo de modelos de resistência aplicados na ultrafiltração de microalgas e emulsões óleo água. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Paraná. Curitiba - PR, 2021. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/xmlui/bitstream/handle/1884/71927/R%20-%20D%20-%20DAIMON%20JEFFERSON%20JUNG%20DE%20OLIVEIRA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
67. Pereira Jr., N.; Bon, E.P.S.; Ferrara, M.A. *Tecnologia de Bioprocessos*, 1. ed. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. 62 p.
68. Perfumo, A. *et al.*, Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02-1. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 72, n. 1, p. 132, 2006.
69. Pirôllo, M. P. S. Estudo Da Produção De Biossurfactantes Utilizando Hidrocarbonetos. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) Instituto de Biociências Rios Claros. UNESP. Rios Claros - SP. 2006. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/e01d04d3-a50b-4e72-8363-daf0331e3494/content>
70. Pornsunthorntawe O, Arttaweeporn N, Paisanjit S, Somboonthanate P, Abe M, Rujiravanit R, Chavadej S (2008) Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant enhanced oil recovery. *Biochem Eng J* 42:172–179
71. Pornsunthorntawe, O.; Wongpanit, P.; Rujiravanit, R. Rhamnolipid biosurfactants: production and their potential in environmental biotechnology. *Advances in experimental medicine and biology*, v. 672, p. 211–221, 2010.
72. Quintela, Bárbara Cibelle Soares Farias. *Biotecnologia aplicada à recuperação avançada de petróleo: injeção de biossurfactantes*. 119 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2018.

73. Radzuan, M. N.; Banat, I. M.; Winterburn, J. Production and characterization of rhamnolipid using palm oil agricultural refinery waste. *Bioresource technology*, v. 225, p. 99–105, 2017.
74. Rodrigues, L. *et al.*, Biosurfactants: potential applications in medicine. *The journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 57, n. 4, p. 609–618, 2006.
75. Ron, E. Z.; Rosenberg, E. Natural roles of biosurfactants. Minireview. *Environmental microbiology*, v. 3, n. 4, p. 229–236, 2001.
76. Salazar-Bryam, A. M. Aproveitamento de glicerol residual como fonte de carbono para produção de ramnolipídios por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*. 89 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada) Instituto de Biociências de Rio Claro. UNESP. Rio Claro, 2016.
77. Salek, K.; Euston, S. R. Sustainable microbial biosurfactants and bioemulsifiers for commercial exploitation. *Process biochemistry (Barking, London, England)*, v. 85, p. 143–155, 2019.
78. Sajid, M. *et al.*, Biosurfactants: Potential applications as immunomodulator drugs. *Immunology letters*, v. 223, p. 71–77, 2020.
79. Santa Anna, L. M. M., Sebastian, G. V., Menezes, E. P. *et al.*, Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments, *Brazilian Journal of Chemical Engineering* v. 19, n. 2, pp. 159-166. 2002
80. Santos, A. S., Sampaio, A. W., Vasquez, G. S. *et al.*, Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* v. 100, n. 1-3, pp. 1025-1036. 2002
81. Santos, D. *et al.*, Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. *International journal of molecular sciences*, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.
82. Sarma, H.; Bustamante, K. L. T.; Prasad, M. N. V. Biosurfactants for oil recovery from refinery sludge: Magnetic nanoparticles assisted purification. In: *Industrial and Municipal Sludge*. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 107–132.
83. Sarubbo, L. A. *et al.*, Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. *Biochemical engineering journal*, v. 181, n. 108377, p. 108377, 2022.
84. Shah, M. U. H. *et al.*, A comparison of recovery methods of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Procedia engineering*, v. 148, p. 494–500, 2016.
85. Sharma, N. *et al.*, Microbial enhanced oil recovery: An overview and case studies. In: *Enhanced Oil Recovery - Selected Topics*. [s.l.] IntechOpen, 2022. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/83069>

86. Shi, X. *et al.*, Biomass rhamnolipid modified poly(vinylidene fluoride) membrane with significantly improved surface hydrophilicity and enhanced antifouling performance. *Chemical engineering science*, v. 212, n. 115330, p. 115330, 2020.
87. Singh, R., Satyannarayana, K. V. V., Vinoth Kumar, R., & Ganesh Moorthy, I. *Membrane Technology in Bioprocess Engineering. The Handbook of Environmental Chemistry*. 2020. doi:10.1007/698\_2020\_505
88. Silva, R. C. R., Alteração da molhabilidade de superfícies internas de tubulações utilizadas no transporte de óleos pesados via core-flow. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Petróleo) – Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia de Petróleo, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Petróleo, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2003.
89. Silva, S. S. Aplicação de rhamnolípídeo no controle de biofilmes de patógenos alimentares. 2016. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
90. Soares Dos Santos, A.; PEREIRA, N., Jr; FREIRE, D. M. G. Strategies for improved rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* PA1. *PeerJ*, v. 4, n. e2078, p. e2078, 2016.
91. Soberón-Chávez, G.; Lépine, F.; Déziel, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 68, n. 6, p. 718–725, 2005.
92. Sodagari, M., & Ju, L.-K. Addressing the critical challenge for rhamnolipid production: discontinued synthesis in extended stationary phase. *Process Biochemistry*. 2019. doi:10.1016/j.procbio.2019.11.036
93. Sodagari, M. L.-K. Ju, Cells were a more important foaming factor than free Rhamnolipids in fermentation of *Pseudomonas aeruginosa* E03-40 for high rhamnolipid production, *J. Surfactants Deterg.* v.17 p. 573–582. 2014. doi:10.1007/s11743-013-1535-4
94. Sohail, R.; JAMIL, N. Isolation of biosurfactant producing bacteria from Potwar oil fields: Effect of non-fossil fuel-based carbon sources. *Green processing and synthesis*, v. 9, n. 1, p. 77–86, 2019.
95. Suh, S.-J.; INVALLY, K.; JU, L.-K. Rhamnolipids: Pathways, Productivities, and Potential. In: *Biobased Surfactants*. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 169–203. doi:10.1016/b978-0-12-812705-6.00005-8
96. Sun, S. *et al.*, A biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* S5 isolated from coking wastewater and its application for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bioresource technology*, v. 281, p. 421–428, 2019.
97. Tahzibi, A.; Kamal, F.; Assadi, M. M. Improved production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *Iranian Biomed. J*, v. 8, p. 25–31, 2004.

98. Trummler, Klaus & Effenberger, Franz & Syldatk, Christoph. (2003). An integrated microbial/enzymatic process for production of rhamnolipids and L-(+)-rhamnose from rapeseed oil with *Pseudomonas sp.* DSM 2874. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 105. 563 - 571. 10.1002/ejlt.200300816.
99. Ulisses, A. F. *et al.*, Verificação experimental de aspectos relevantes sobre a tensão superficial em uma abordagem didática. Instituto Federal do Espírito Santo. *Revista Ifes Ciência*, v. 3, nº 2, 2017. Disponível em: <https://ojs.ifes.edu.br/index.php/ric/article/download/318/281/1203>.
100. Varjani, S. J. Biosurfactants in microbial enhanced oil recovery. In: *Modern Tools and Techniques to Understand Microbes*. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 369–379.
101. Varjani, S. J.; Upasani, V. N. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresource technology*, v. 232, p. 389–397, 2017.
102. Varjani, S. *et al.*, Bio-based rhamnolipids production and recovery from waste streams: Status and perspectives. *Bioresource technology*, v. 319, n. 124213, p. 124213, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124213>
103. Verma, R. *et al.*, Enhanced production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* RSL2 in semicontinuous bioreactor utilizing molasses as a sole substrate. *Journal of biotechnology*, v. 362, p. 24–35, 2023.
104. Veloso, Y.; Cruz, A.; Machado, L.; De Santana, A.P.S.C; Método De Recuperação Avançada De Petróleo Utilizando Injeção De Glicerina Bruta E Polímeros. *Cadernos De Graduação. Ciências Exatas E Tecnológicas - Unit. Aracaju*. v. 2. n.2. p.37-48. out. 2014. Disponível em: <https://periodicos.set.edu.br/cadernoexatas/article/download/1744/1020/5788>
105. Witek-Krowiak, A. *et al.*, Ultrafiltrative separation of rhamnolipid from culture medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 27, n. 8, p. 1961–1964, 2011.
106. Yuliani, H. *et al.*, Antimicrobial activity of biosurfactant derived from *Bacillus subtilis* C19. *Energy procedia*, v. 153, p. 274–278, 2018.
107. Zhang, G.-L. *et al.*, Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, v. 6, n. 8, p. 725–730, 2005.
108. Zheng, H. *et al.*, Production and separation of *pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids using coupling technology of cyclic fermentation with foam fractionation. *Genie des procedes [Chemical engineering and processing]*, v. 148, n. 107776, p. 107776, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.107776>