



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE ENGENHARIA E ARQUITETURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL
Área de Concentração: Infraestrutura e Meio Ambiente

Roberta Schmitz

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DA MICROALGA
***Spirulina platensis* E SEU USO EM BIORREMEDIAÇÃO**

Passo Fundo
2013

Roberta Schmitz

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DA MICROALGA
Spirulina platensis E SEU USO EM BIORREMEDIAÇÃO

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Luciane Maria Colla

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental para obtenção do grau de Mestre em Engenharia na Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo na Área de concentração Infraestrutura e Meio Ambiente.

Passo Fundo
2013

ROBERTA SCHMITZ

**PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS E BIOSSURFACTANTES A PARTIR DA
MICROALGA *Spirulina platensis* E SEU USO EM BIORREMEDIAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental para obtenção do grau de Mestre em Engenharia na Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo na Área de concentração Infraestrutura e Meio Ambiente.

Data de aprovação: Passo Fundo, 14 de Janeiro de 2013.

Os membros componentes da Banca Examinadora abaixo aprovam a Dissertação.

Doutora Luciane Maria Colla
Orientadora

Doutor Antônio Thomé
Universidade de Passo Fundo (UPF)

Doutora Fátima Menezes Bento
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Doutor Jorge Alberto Vieira da Costa
Fundação Universidade de Rio Grande (FURG)

Passo Fundo
2013

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus, minha fortaleza, ter me permitido chegar até aqui.

Agradeço a meus pais, João Felipe e Alice, os quais me trouxeram à vida, e me ensinaram as suas mais belas lições... os quais nunca mediram esforços para que eu conseguisse alcançar os meus objetivos...

Ao amor da minha vida, Everton, que soube ocupar seu espaço através da sua simplicidade, sinceridade, amizade e especialmente amor. Obrigada por tanto amor, pelas palavras, partilhas, conselhos, através das nossas longas conversas...

Aos meus amigos: Lisi, Naira, Clinei, Gui, Rafa, Stevan e Valter, obrigada pelas conversas, momentos de estudo ou diversão, obrigada por vocês existirem, obrigada por fazerem parte da minha vida!

Obrigada a toda galera do Laboratório de Fermentações, pela amizade, risadas, partilhas, aprendizado. Obrigada de forma especial à Andressa, Cindy, Gabi e Kelly, que estiveram diretamente envolvidas durante a realização dos experimentos.

Aos professores Marcelo e Vandrê, pelas contribuições nas bancas de defesa do Projeto de Pesquisa e da Qualificação.

À prof. Luciane, muito mais do que uma orientadora, uma amiga. Obrigada por todos os conhecimentos partilhados, experiências de vida.

À UPF e Capes pela concessão da bolsa de estudos.

Obrigada!!!!

*"... aprendi que tudo o que Deus faz dura para sempre."
(Ecle 3,14)*

RESUMO

A produção de biomassa, bem como o acúmulo de lipídios em microalgas tem sido foco de muitos estudos nos últimos anos, tendo em vista seu potencial para aplicação na área ambiental. Os lipídios microalgais podem apresentar atividade biossurfactante, apresentando aplicações nos mais diferentes setores. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de lipídios microalgais e caracterizar a atividade surfactante destes lipídios utilizando a microalga *Spirulina platensis*, cepas LEB -52 e Paracas. Foram estudadas as condições de cultivo que permitiram a produção de biomassa, bem como o acúmulo de lipídios na microalga através de bioprocessos submersos, sendo estudados como indutores glicose, ferro e glicerol. Os lipídios foram caracterizados quanto à atividade emulsificante através da determinação das atividades emulsificantes (AE) óleo em água (OA) e água em óleo (AO). Após, os lipídios microalgais foram utilizados em um processo de biorremediação de solo contaminado com 4,0 % de diesel ou biodiesel e 0,5 % de biossurfactante a fim de caracterizar esta aplicação ambiental. Os ensaios apresentaram concentração celular máxima (C_{max}) de 5,70 $g_{célula}/L$, para a cepa Paracas e 3,82 $g_{célula}/L$ para a cepa LEB-52. O percentual de lipídios obtidos foi de 9,51 % no ensaio adicionado de ferro e glicerol para a cepa Paracas e 6,87% no ensaio com a adição de todos os indutores para a cepa LEB-52, o que representa um incremento de 39,5% e 84,91% respectivamente, no perfil lipídico de cada cepa da microalga. Com relação às atividades emulsificantes (AE) óleo em água (OA) e água em óleo (AO) obteve-se AE OA 2,78 UE/ $mg_{lipídio}$ no ensaio com adição de todos os indutores para a cepa Paracas, e 4,93 UE/ $mg_{lipídio}$ no ensaio adicionado de ferro e glicerol para a cepa LEB-52; as AE AO obtidas foram de 71,64 UE/ $mg_{lipídio}$ (no ensaio adicionado de todos os indutores) para a cepa Paracas, e de 187,76 UE/ $mg_{lipídio}$ (no ensaio adicionado de ferro e glicerol) para a cepa LEB-52. Os lipídios microalgais demonstraram seu potencial para aplicação na biorremediação de solo contaminado com diesel e biodiesel, sendo obtidos 81,9 % e 81,7 % de biodegradação para o biodiesel e diesel respectivamente, nos ensaios realizados com adição dos lipídios microalgais em 60 d de ensaio. A evolução de CO_2 , que representa a atividade microbiana no solo apresentou resultados elevados de C (mg) acumulado nos ensaios adicionados do biossurfactante: de 1.341,65 mg e 775,3 mg de C para o biodiesel e diesel, respectivamente.

Palavras-chave: ferro, glicerol, glicose, indutor, mixotrófico, biodegradação

ABSTRACT

The biomass production and lipids accumulation of in microalgae have been the focus of many studies in recent years, in view of their potential for application in the environmental area. The lipids may present biosurfactant activity, which also present applications in the most different sectors. The aim of this work was to evaluate the production of microalgal lipids and characterize their surfactant activity . The strains *Spirulina platensis* LEB -52 and *Spirulina platensis* Paracas were used. The cultivation conditions that allowed the production of biomass and the accumulation of lipids in microalgae were studied through submerged bioprocess, being the variables studied the addition of glucose, glycerol and iron, in fed-batch mode. The lipids were used to the determination of oil in water (OW) and water in oil (WO) emulsifying activity (EA). After, the microalgal lipids were used in a bioremediation process of a soil contaminated with 4,0% of diesel and biodiesel. The microalgal biosurfactant was added in the quantity of 0.5% in order to characterize this environmental application. The results showed maximum cellular concentration (C_{max}) of 5,70g/L to the strain Paracas and 3.82 g/L for the strain LEB-52. The percentage of lipids obtained was 9.51% in the experiment made with the addition of iron and glycerol to strain Paracas, and 6.87% in the experiment accomplished with the addition of all inductors to strain LEB-52, which represents increments of 39.5 % and 84.91 % respectively, in the lipid profile of each strain of microalgae. In relation to OW and WO emulsifiers activities , high activities were obtained for both strains: EA_{WO} of 2.78 UE/mg_{lipids} in the test with the addition of all inducers for the strain Paracas, and 4.93 UE/mg_{lipids} in the experiment added of iron and glycerol to strain LEB-52; EA_{WO} of 71.64 UE/mg_{lipids} was obtained in the experiment added of all inductors to strain Paracas, and 187.76 UE/mg_{lipids} in assay added of iron and glycerol to strain LEB-52. The microalgal lipids demonstrated their potential application in bioremediation of diesel and biodiesel, being obtained 81.9 % and 81.7 % of biodegradation for biodiesel and diesel respectively, in tests performed with addition of lipids in microalgal 60 d test. The CO₂ evolution test, which represents the microbial activity in the soil, showed elevated C (mg) accumulated in the experiments added of biosurfactant, with 1,341.65 mg and 775.3 mg of C for the soils contaminated with biodiesel and diesel, respectively.

Keywords: iron, glycerol, glucose, inductor, mixotrophic, biodegradation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Acúmulo de biossurfactante nas interfaces líquido e ar.....	34
Figura 2. Relação: Concentração de biossurfactante, tensão superficial e formação de micelas	36
Figura 3. Superfície de resposta da interação entre as variáveis glicose (X_1) x glicerol (X_3)..	69
Figura 4. Curvas de crescimento microalgal dos ensaios da <i>Spirulina platensis</i> , cepa Paracas.	70
Figura 5. Superfície de resposta da interação das variáveis glicose (X_1) x ferro (X_2) sobre a concentração de lipídios.	74
Figura 6. Superfície de resposta glicose (X_1) x glicerol (X_3) sobre a concentração de lipídios.	74
Figura 7. Curvas de crescimento microalgal dos ensaios da <i>Spirulina platensis</i> , cepa Paracas, PFC 2 ²	80
Figura 8. Superfície de resposta da interação entre as variáveis Ferro (X_1) e Glicerol (X_2) sobre AE AO.	83
Figura 9. Curvas de crescimento microalgal dos ensaios da <i>Spirulina platensis</i> , cepa LEB-52	87
Figura 10. Superfície de resposta entre as variáveis ferro (X_2) x glicerol (X_3) sobre a concentração de lipídios.	90
Figura 11. Superfície de resposta referente a interação das variáveis ferro (X_2) x glicerol (X_3) sobre AE OA.	92
Figura 12. Superfície de resposta da interação entre as variáveis glicose (X_1) x ferro (X_2) sobre a AE AO.....	92
Figura 13. Evolução de CO ₂ ao longo dos 60 d do ensaio.	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais classes de biossurfactantes e micro-organismos envolvidos	35
Tabela 2. Biossurfactantes, organismos produtores e suas aplicações nos últimos anos	38
Tabela 3. Planejamento Fatorial completo 2^3 com três pontos centrais para avaliação do efeito da adição de glicose, glicerol e ferro sobre o crescimento e a produção de lipídios intracelulares com atividade emulsificante na microalga <i>Spirulina platensis</i> , cepas LEB-52 e PARACAS.....	55
Tabela 4. Planejamento Fatorial completo 2^2 com quatro pontos centrais para avaliação do efeito ferro e glicerol sobre o crescimento e a produção de lipídios intracelulares com atividade emulsificante na microalga <i>Spirulina platensis</i> cepa PARACAS.	56
Tabela 5. Ensaios de Biorremediação.....	60
Tabela 6. Caracterização geotécnica e física do solo utilizado	61
Tabela 7. Caracterização química do solo	62
Tabela 8. Parâmetros de crescimento celular dos experimentos do PFC 2^3 para o cultivo em estado submerso da <i>Spirulina platensis</i> , cepa Paracas.	66
Tabela 9. Efeitos estimados e coeficientes de regressão a partir das variáveis do planejamento 2^3 sobre C_{max} dos experimentos do cultivo em estado submerso <i>Spirulina platensis</i> , cepa Paracas.....	68
Tabela 10. Análise de variância do modelo de regressão gerado a partir da influência das variáveis do planejamento sobre C_{max} dos experimentos do cultivo de <i>Spirulina platensis</i> , cepa Paracas. $R^2 = 0,92339$	69
Tabela 11. Percentuais de lipídios e determinações referentes à Atividade Emulsificante (AE A/O e O/A) dos lipídios obtidos a partir das biomassas obtidas no PFC 2^3 para a <i>Spirulina platensis</i> , cepa Paracas.	71
Tabela 12. Efeitos estimados e coeficientes de regressão a partir das variáveis do planejamento sobre a concentração de lipídios dos experimentos do cultivo da <i>Spirulina platensis</i> , cepa Paracas.	73
Tabela 13. Análise de variância do modelo de regressão gerado a partir da influência das variáveis do planejamento sobre a concentração de lipídios dos experimentos do cultivo de <i>Spirulina platensis</i> , cepa Paracas. $R^2=0,92137$	73
Tabela 14. Efeitos estimados e coeficientes de regressão obtidos a partir das variáveis do planejamento sobre AE OA dos lipídios extraídos dos cultivos de <i>Spirulina platensis</i> , cepa Paracas.....	76
Tabela 15. Determinações das Atividades Emulsificantes (AE OA e AO) das diferentes diluições dos extratos lipídicos.....	77
Tabela 16. Efeitos estimados e coeficientes de regressão a partir das variáveis do planejamento sobre AE OA e AO dos lipídios dos experimentos do cultivo de <i>Spirulina platensis</i> (cepa Paracas).....	78
Tabela 17. Parâmetros de crescimento celular dos experimentos do cultivo em estado submerso <i>Spirulina platensis</i> , cepa Paracas (PFC 2^2).	79
Tabela 18. Percentuais de lipídios e determinações referentes à Atividade Emulsificante (AE A/O e O/A) dos lipídios obtidos a partir das biomassas obtidas no PFC 2^2 para a <i>Spirulina platensis</i> , cepa Paracas.	81
Tabela 19. Efeitos estimados e coeficientes de regressão a partir das variáveis do PFC 2^2 sobre AE OA e AO dos lipídios obtidos dos cultivos da <i>Spirulina platensis</i> , cepa Paracas.....	82
Tabela 20. Comparativo de parâmetros obtidos nos PFC 2^2 e PFC 2^3 a partir dos cultivos de <i>Spirulina platensis</i> , cepa Paracas.....	85
Tabela 21. Parâmetros de crescimento celular dos experimentos do cultivo de <i>Spirulina platensis</i> , cepa LEB-52.....	86

Tabela 22. Percentuais de lipídios e atividades emulsificantes (AE A/O e O/A) dos lipídios obtidos a partir das biomassas obtidas no PFC 2 ³ para a <i>Spirulina platensis</i> , cepa LEB-52. .	88
Tabela 23. Efeitos estimados e coeficientes de regressão a partir das variáveis do planejamento sobre a concentração de lipídios dos experimentos realizados com <i>Spirulina platensis</i> , cepa LEB-52. R ² =0,97623.....	89
Tabela 24. Análise de variância do modelo de regressão gerado a partir da influência das variáveis do planejamento sobre a concentração de lipídios do cultivo da <i>Spirulina platensis</i> , cepa LEB-52. R ² =0,97623.....	90
Tabela 25. Efeitos estimados a partir das variáveis do planejamento sobre AE OA e AO dos lipídios extraídos dos cultivos da <i>Spirulina platensis</i> , cepa LEB-52.	91
Tabela 26. Comparativo de parâmetros obtidos nos cultivos de <i>Spirulina platensis</i> , cepas Paracas e LEB-52 a partir dos PFC 2 ³	94
Tabela 27. Modelo de Regressão da curva para quantificação de CO ₂ evoluído.....	96
Tabela 28. Percentual de biodegradação ao longo dos 60 d do ensaio.....	97
Tabela 29. Efeitos estimados e coeficientes de regressão gerados a partir das variáveis sobre a Evolução de CO ₂	99
Tabela 30. Efeitos estimados e coeficientes de regressão gerados a partir das variáveis sobre o percentual de biodegradação de óleos e graxas.	100
Tabela 31. Teste de Tukey para comparação das médias das variáveis sobre % de biodegradação.....	100

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 MICROALGAS.....	15
2.1.1.1 <i>Spirulina sp.</i>	16
2.1.2 Aplicações ambientais do uso da microalga <i>Spirulina platensis</i>	17
2.1.2.1 Fixação de CO ₂ oriundo de termelétricas.....	17
2.1.2.2 Tratamento de efluentes e bioissorção de metais tóxicos.....	18
2.1.2.3 Produção de biocombustíveis de microalgas.....	19
2.1.2.3.1 Produção de bioetanol.....	20
2.1.2.3.2 Produção de biodiesel.....	21
2.1.2.4 Produção do biossurfactantes.....	23
2.1.3 Condições de cultivo.....	24
2.1.3.1 Luz.....	25
2.1.3.2 Temperatura.....	26
2.1.3.3 pH.....	26
2.1.3.4 Mistura e aeração.....	27
2.1.3.5 Salinidade.....	27
2.1.3.6 Requerimentos nutricionais.....	28
2.1.3.6.1 Fonte de nitrogênio.....	28
2.1.3.6.2 Fonte de carbono.....	29
2.1.3.6.3 Fonte de ferro.....	30
2.1.3.6.4 Fonte de fósforo.....	31
2.1.3.6.5 Outros nutrientes.....	31
2.1.4 Perfil lipídico das microalgas.....	31
2.2 BIOSSURFACTANTES.....	32
2.2.1 Definição e caracterização.....	33
2.2.2 Funções fisiológicas.....	33
2.2.3 Classes de biossurfactantes.....	34
2.2.4 Propriedades dos biossurfactantes.....	35
2.2.5 Micro-organismos produtores de biossurfactantes.....	37
2.2.6 Aplicações ambientais dos biossurfactantes.....	39
2.2.6.1 Recuperação melhorada do petróleo (MEOR).....	39
2.2.6.2 Biorremediação de petróleo.....	39
2.2.6.3 Biorremediação de solos contaminados por metais.....	40
2.3 BIORREMEDIAÇÃO.....	41
2.3.1 Atenuação Natural.....	42
2.3.2 Bioestimulação.....	42
2.3.3 Micro-organismos do solo.....	43
2.3.4 Fatores determinantes na biorremediação.....	44
2.3.4.1 Nutrientes.....	45
2.3.4.2 Potencial redox.....	46
2.3.4.3 pH.....	47
2.3.4.4 Temperatura.....	48
2.3.4.5 Umidade.....	49
2.3.5 Contaminantes.....	49
2.3.5.1 Diesel.....	51
2.3.5.2 Biodiesel.....	51
2.3.6 Respirometria.....	52

3 MATERIAIS E MÉTODOS	54
3.1 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES.....	54
3.1.1 MICRO-ORGANISMO E MANUTENÇÃO DO INÓCULO.....	54
3.1.2 Cultivo da microalga <i>Spirulina platensis</i>	54
3.1.2.1 Filtração e liofilização da biomassa.....	57
3.1.2.2 Extração e determinação de lipídios.....	58
3.1.2.3 Determinação da atividade emulsificante dos lipídios extraídos.....	58
3.2 BIOSSURFACTANTES MICROALGAIS NA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM DIESEL E BIODIESEL.....	60
3.2.1 Caracterização do solo utilizado.....	60
3.2.2 Determinação do teor de umidade.....	63
3.2.3 Liberação/Evolução de CO ₂	63
3.2.4 Análise de óleos e graxas.....	65
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	66
4.1 Produção de Biossurfactantes.....	66
4.1.1 Produção de Biossurfactantes pela <i>Spirulina platensis</i> cepa Paracas.....	66
4.1.1.1 Crescimento microalgal.....	66
4.1.1.2 Quantificação lipídios e Atividade Emulficante dos lipídios produzidos.....	70
4.1.2 Cepa Paracas (PFC 2 ²).....	78
4.1.2.1 Crescimento microalgal.....	78
4.1.2.2 Quantificação lipídios e Atividade Emulsificante dos lipídios produzidos.....	80
4.1.3 Produção de Biossurfactantes pela <i>Spirulina platensis</i> , cepa LEB-52.....	86
4.1.3.1 Crescimento microalgal.....	86
4.1.3.2 Quantificação lipídios e Atividade Emulficante dos lipídios produzidos.....	88
4.2 Uso dos biossurfactantes em Biorremediação.....	95
4.2.1 USO DOS LIPÍDIOS MICROALGAIS EXTRAÍDOS EM ENSAIO DE BIORREMEDIAÇÃO.....	95
4.2.1.2. Evolução de CO ₂ e Biodegradação do contaminante.....	95
4.2.1.2.1 Análise estatística dos resultados.....	99
CONCLUSÃO	102
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	103
REFERÊNCIAS	104
ANEXO 1 – MEIO ZARROUK	116
ANEXO 2 – MÉTODO PARA EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDIOS	117
APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO	118
APÊNDICE B – CRESCIMENTO CELULAR	119
APÊNDICE C – DETERMINAÇÃO DE LIPÍDIOS	121
APÊNDICE D – DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES EMULSIFICANTES	123
APÊNDICE E – EVOLUÇÃO DE CO₂	145
APÊNDICE F – DETERMINAÇÃO DE ÓLEOS E GRAXAS	146

1 INTRODUÇÃO

As microalgas tem sido foco de muitos estudos nos últimos anos tendo em vista sua grande aplicabilidade nas mais diferentes áreas, tais como indústria de alimentos, indústria farmacêutica, biomedicina, área ambiental. A utilização da biomassa da microalga *Spirulina platensis* tem apresentado grande potencial de utilização em todos esses setores com destaque especial na área ambiental, pois pode ser utilizada na biofixação de CO₂; tratamento de efluentes; biossorção de metais, tanto de efluentes e como de solos contaminados; produção de biocombustíveis (biodiesel e bioetanol) e produção de biossurfactantes, isto é, moléculas de origem lipídica com alto potencial de aplicação ambiental devido às suas características específicas como biodegradabilidade e atoxicidade.

O uso da microalga *Spirulina platensis* traz algumas vantagens, tais como: a possibilidade de crescimento em meios de cultivo de difícil contaminação (elevado pH), a sua atoxicidade, tornando possível a geração de co-produtos de alto valor agregado para aplicação em inúmeras áreas, e a facilidade de cultivo, em virtude da sua característica filamentososa, em comparação com outras algas.

Os biossurfactantes são compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, e consistem em sub-produtos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras. Podem ser produzidos extracelularmente ou como parte da membrana celular desses micro-organismos. Os biossurfactantes têm sido produzidos extensivamente pelos mais diversos tipos de micro-organismos, especialmente por bactérias e leveduras e, com menor intensidade de estudos, por fungos filamentosos. A produção de biossurfactantes por microalgas traz como principal vantagem a atoxicidade do micro-organismo e do bioproduto obtido, o qual poderá ser utilizado em processos de biorremediação, que por sua vez trata-se de um processo de tratamento ativo que usa micro-organismos para degradar e transformar em químicos orgânicos os contaminantes do solo, sedimentos e resíduos.

Os indutores glicose, ferro e glicerol foram selecionados tendo em vista estudos realizados anteriormente por diversos autores e pelo grupo de pesquisa com o objetivo de induzir o crescimento e acúmulo de lipídios intracelulares. A glicose demonstrou-se em vários estudos que a sua adição ao meio de cultivo da *Spirulina platensis* contribui de forma positiva para o crescimento celular. O glicerol, por sua vez, é um resíduo abundante atualmente, em virtude do estímulo à produção de biodiesel. A utilização deste resíduo em bioprocessos como componente dos meios de cultivo seria uma alternativa econômica para a diminuição dos

custos de produção dos biocompostos. O ferro tem se demonstrado um bom indutor para crescimento, uma vez que atua diretamente na fotossíntese, e bem como para o acúmulo de lipídios totais no micro-organismo.

O objetivo geral deste trabalho foi a produção de lipídios com atividade surfactante através da microalga *Spirulina platensis* e utilização destes compostos em processos de biorremediação de resíduos oleosos.

Os objetivos específicos foram:

- a) Avaliar a influência da adição dos indutores glicose, ferro e glicerol sobre o crescimento e produção de lipídios intracelulares na microalga *Spirulina platensis*;
- b) Realizar a quantificação dos lipídios obtidos a partir da biomassa seca;
- c) Avaliar a capacidade surfactante dos lipídios extraídos;
- d) Utilizar os biosurfactantes extraídos da microalga *Spirulina platensis* em um processo de biorremediação de resíduos oleosos em solos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MICROALGAS

As microalgas fazem parte de grupo muito heterogêneo de organismos. São predominantemente aquáticos e geralmente microscópicos unicelulares, podendo formar colônias, e apresentar pouca ou nenhuma diferenciação celular. Sua coloração variada é característica oportunizada pela presença de pigmentos e mecanismo fotoautotrófico. Filogeneticamente, as microalgas são compostas de espécies procarióticas ou eucarióticas, antigas ou mais recentes, conforme o período em que surgiram no planeta (RAVEN et al., 2005). O termo “microalgas” não tem valor taxonômico, uma vez que engloba micro-organismos algais com clorofila e outros pigmentos fotossintéticos capazes de realizar a fotossíntese oxigênica (PÉREZ, 2007).

Andrade et al. (2008) e Chisti (2007) caracterizam as microalgas como micro-organismos fotossintéticos, que combinam água e dióxido de carbono atmosférico com luz solar para produzirem várias formas de energia para produzirem biomassa (polissacarídeos, proteínas, lipídios e hidrocarbonetos), que pode ser utilizada na produção de biocombustíveis e suplementos alimentares, e também podem ser empregados na captura de dióxido de carbono da atmosfera. De acordo com Pérez (2007) elas são extremamente importantes para a manutenção da vida na Terra. Acredita-se que as microalgas produzam mais oxigênio de que todas as plantas juntas existentes no mundo, e que são elas as responsáveis por pelo menos 60% da produção primária da Terra, conforme descrito por CHISTI (2004).

A biomassa microalgal apresenta cerca de 50 % de carbono na sua composição, assim o fornecimento deste nutriente aos cultivos representa um importante componente dos custos de produção, seja gasoso na forma de dióxido de carbono, ou sólido, principalmente na forma de bicarbonato (VONSAHK, 1997).

Segundo Possatto (2009) para que espécies de microalgas possam produzir satisfatoriamente várias formas de energia, é indispensável cuidados no processo e sistemas de cultivo dos micro-organismos, considerando as peculiaridades de cada espécie, adaptação ao ambiente, bem como a disponibilidade de nutrientes associados à viabilidade econômica.

2.1.1.1 *Spirulina* sp.

A espécie *Spirulina* foi classificada novamente, agora com o nome de *Arthrospira* sp., e aceita oficialmente em *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. No entanto, a denominação *Spirulina* permanece tanto comercialmente como em publicações científicas. Compreendem cianobactérias filamentosas, e sua principal característica morfológica é a disposição dos tricomas multicelulares cilíndricos em uma hélice esquerda aberta ao longo de todo o comprimento (TOMASELLI, 1997).

Segundo Tomaselli (1997) as *Spirulinas* são cianobactérias planctônicas que habitam em corpos de água tropical e subtropical caracterizados por elevados níveis de carbonato e bicarbonato e pH elevado (até 11). Elas tem sido encontradas nos mais diferentes ambientes como águas salobras, mar, piscinas de maré, lagoas salinas, também têm sido encontrada em águas sub-árticas, lagoas tropicais, e fontes de águas termais. Assim, estes organismos parecem ser capazes de adaptação a condições ambientais extremas (CIFERRI e TIBONI, 1985).

Segundo Tomaselli (1997) apud Marty e Busson (1970); Eykelenburg (1977 e 1979); Tomaselli et al. (1993) as células de *Spirulina platensis* e *Spirulina máxima*, quando observar em microscopia eletrônica, são típicas de organismos procarióticos, sem núcleo delimitado morfológicamente e desprovidas de plastídios. Apresentam parede celular como um envelope externo tipo gram-negativa. Sob microscopia de luz, o azul-esverdeado dos filamentos não heterocísticos, composto das células vegetativas que sofrem fissão binária em um único plano, mostram facilmente visíveis paredes transversais. Os filamentos são solitários e livres e flutuam exibindo motilidade. Os tricomas, são envoltos por uma bainha fina, que pode se mostrar mais ou um pouco pronunciada nas constrições da parede transversal, apresenta ápices um pouco ou nada atenuados (CIFERRI e TIBONI, 1985).

De acordo com Ciferri e Tiboni (1985) todos os membros do gênero *Spirulina* são fotoautotróficos, e realizam fotossíntese aeróbica, não são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico, exceto *S. labyrinthiformis*, uma espécie termofílica isolada de fontes de água quente, sobre a qual foi relatado ser capaz de realizar fotossíntese anoxigênica à custa de sulfuretos, conforme Castenholz (1976) apud Ciferri e Tiboni (1985).

Semelhantemente ao que ocorre em outros organismos, cada classe de microalgas apresenta sua própria combinação de pigmentos e, conseqüentemente, coloração distinta. Os três principais grupos de pigmentos encontrados na biomassa microalgal são as clorofilas, os carotenoides e as ficobilinas (ficobiliproteínas) (ABALDE et al., 1995).

2.1.2 Aplicações ambientais do uso da microalga *Spirulina platensis*

O meio ambiente tem sido foco de inúmeras discussões e estudos nos últimos anos, uma vez que tem se tomado consciência de que os recursos naturais são finitos e por isso devem ser preservados. Cada vez mais se busca alternativas para sua preservação bem como a recuperação de recursos naturais e locais degradados pela ação do homem.

Nesse tópico, serão apresentadas algumas das ações que já estão em sendo estudadas e desenvolvidas no que se refere também a utilização de meios naturais de remediação. As microalgas, por serem micro-organismos fotossintetizantes, têm contribuído muito para esses estudos. Destacam-se os estudos:

- a) sequestro de CO₂ oriundo de termelétricas;
- b) tratamento de efluentes: remoção de DQO e biossorção de metais tóxicos;
- c) utilização como biossurfactantes, em biorremediação de locais contaminados com derrames de petróleo e seus derivados;
- d) produção de biocombustíveis, tais como biodiesel e bioetanol.

2.1.2.1 Fixação de CO₂ oriundo de termelétricas

A fotossíntese é a principal rota de fixação de carbono da *Spirulina platensis*, sendo a luz solar sua principal fonte de energia. Por meio da fotossíntese, converte os nutrientes em matéria celular e libera oxigênio. Os nutrientes de que necessita são uma fonte de carbono, nitrogênio, fósforo, potássio, ferro e outros oligoelementos (VONSHAK, 1997).

A biofixação de dióxido de carbono (CO₂) por microalgas tem provado ser um método eficiente e econômico, principalmente devido à capacidade fotossintética desses micro-organismos ao uso deste gás como fonte de nutrientes para o seu desenvolvimento. Rosa et al. (2011) estudaram o crescimento das microalgas *Spirulina* LEB18 e *Chlorella kessleri*, expostas a condições controladas e não controladas, com a injeção de diferentes concentrações de CO₂. Verificaram que a maior concentração de biomassa e fixação máxima diária foram obtidas para *Spirulina LEB18* na cultura que foi preparada em condições não controladas com uma injeção de 6% (v / v) de CO₂. Para *C. kessleri* teve taxa de crescimento máximo específico quando cultivada com 18 % (v / v) de CO₂ em condições de cultivo não controladas.

Radmann et al. (2011) realizaram estudo e projetaram uma planta piloto para biofixação de CO₂ oriundo da Usina Termelétrica Presidente Médici (UTPM), localizada no município de Candiota/RS com o objetivo de utilizar gás de combustão da usina para o cultivo das microalgas *Spirulina* sp. LEB-18 e *Scenedesmus obliquus* LEB-22, determinando suas características cinéticas e capacidade de fixação de CO₂. Nesse estudo observaram que a utilização de gás de combustão da UTPM incrementou em 35 % a produção de biomassa ao final do cultivo de *Spirulina* sp. LEB-18, com redução de 24,2% da concentração de CO₂ do gás de combustão, sendo biofixado 5,7% do CO₂ para o crescimento das microalgas. A biomassa final das microalgas *S. obliquus* LEB-22 e *Spirulina* LEB-18 cultivadas com gás de combustão apresentou 6,2% e 4,8% de lipídios, e 40,6% e 46,8% de proteínas, respectivamente. Os resultados mostram que as microalgas podem ser cultivadas em plantas de energia elétrica para biofixar o CO₂ proveniente do gás de combustão de carvão e contribuir para redução do aquecimento global.

Morais e Costa (2007) testaram em fotobiorreatores tubulares a capacidade de biofixação de CO₂ por microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Spirulina* sp. em concentrações de situação limitada e em excesso de CO₂. A *Spirulina* apresentou os melhores resultados em todos os parâmetros avaliados, dentre eles a taxa de crescimento específica, produtividade e biofixação de CO₂.

2.1.2.2 Tratamento de efluentes e biossorção de metais tóxicos

A utilização da água tanto para processos produtivos quanto para abastecimento humano acarreta a geração de um grande volume de efluentes, os quais necessitam de tratamento adequado para após, serem lançados novamente no ambiente. A disposição adequada de efluentes tem sido alvo de estudos de muitos pesquisadores no mundo inteiro, especialmente no que se refere ao seu descarte de forma que atenda aos parâmetros ambientais.

Os efluentes podem conter em sua composição as mais diferentes substâncias, o que vai depender que tipo de efluente, qual a sua origem. Muitos efluentes podem conter grande quantidade de matéria orgânica, ou ainda apresentar em suas concentrações metais tóxicos.

Mezzomo et al. (2010) utilizaram efluente de suíno, rico em fósforo e nitrogênio inorgânicos, para a produção de biomassa de microalga *Spirulina platensis*, no qual verificaram que a cultura de *Spirulina* em efluente suíno demonstrou a possibilidade do seu uso na remoção de DQO e fósforo, além da produção de biomassa, podendo ser uma possível

solução para o impacto ambiental gerado pela descarga de efluentes em fontes naturais. O estudo destacou que a biomassa produzida pode ser adicionada a rações de peixes, os quais podem ser utilizados na formulação de produtos cárneos.

Para efluentes que apresentam em sua composição metais pesados, Dal Magro e colaboradores (2012) utilizaram a microalga *Spirulina platensis* na remoção de Cromo VI e DQO de efluente, obtendo resultados satisfatórios, uma vez que a microalga *Spirulina* apresentou capacidade de bioissorção de Cromo VI (superior a 40%) e remoção de DQO (60 a 70%). Aneja et al. (2010) avaliaram a bioissorção de Pb^{+2} e Zn^{+2} de uma solução aquosa contendo diferentes concentrações desses metais, através da biomassa seca da *Spirulina sp.*, onde atingiram índices de bioissorção de 82 % para Pb^{+2} e de 90 % para Zn^{+2} . Gokhale et al. (2009) realizaram ensaios de bioissorção de cromo (VI) em colunas empacotadas utilizando a biomassa seca da *Spirulina platensis* como material adsorvente, atingindo, em condições experimentais otimizadas, a remoção de até 99% do metal para uma solução contendo 100 mg. L⁻¹ de cromo (VI). Siva Kiran et al. (2012) avaliaram a capacidade da biomassa ativa da *Spirulina (Arthospira)* indica na bioissorção de Cd^{+2} , alcançando remoções de até 93,9% desse metal, sendo que a taxa de remoção aumentou com o aumento da concentração inicial do metal.

Para verificar o efeito causado por metais tóxicos no crescimento de microalgas, Belokobylsky et al. (2004), submeteram a *Spirulina platensis* ao crescimento na presença de Se (VI) e Cr (III), onde avaliaram o efeito dos metais separadamente e de forma conjugada, concluindo que a acumulação de Cr (III) foi maior que a acumulação de Se (VI) e a presença dos dois metais, simultaneamente, afetou a taxa de crescimento da biomassa sem alterar sua morfologia e conteúdo proteico.

2.1.2.3 Produção de biocombustíveis de microalgas

O cultivo de microalgas para produção de biocombustíveis apresenta vantagens com relação a culturas de oleaginosas, no sentido de ter alto potencial na produção de lipídios utilizando-se de menores áreas agricultáveis, bem como menor espaço de tempo (WIJFFELS; BARBOSA, 2010).

Conforme Meng et al. (2008) e Huang et al. (2009), apesar de existirem inúmeros tipos de micro-organismos, tais como microalgas, bacilos, fungos, entre outros, nem todos possuem características favoráveis à produção de lipídios para a aplicação na produção de

biodiesel. As microalgas destacam-se por apresentarem, em alguns casos, compatibilidade na relação de seu óleo produzido ao óleo vegetal utilizado no processo de transesterificação.

O óleo extraído de microalgas apresenta características semelhantes as dos óleos de plantas oleaginosas e se enquadra dentro das principais características exigidas pela ANP (Agência Nacional de Petróleo) para qualidade do biodiesel, como o ponto de fulgor mínimo de 115°C e baixo índice de acidez (menor que 0,8 mg KOH/g) (TEIXEIRA, 2008). Entre as diversas matérias-primas para a produção de biodiesel, a biomassa de microalgas é aquela que apresenta a possibilidade de produção de biodiesel que permitirá a substituição total do diesel (cerca de 40 bilhões de litros por ano) e de modo ambientalmente sustentável (TEIXEIRA et al., 2010).

O acúmulo de lipídios em microalgas para a produção de biodiesel tem sido um foco atual de trabalho de inúmeros pesquisadores em todo o mundo. A utilização de lipídios de microalgas, segundo inúmeros autores, apresenta vantagens em comparação com as fontes convencionais de lipídios, tais como:

- a) a elevada produtividade em lipídios por área cultivada, em comparação com culturas oleaginosas agriculturáveis;
- b) capacidade de sintetizar e acumular grandes quantidades de lipídios neutros;
- c) elevadas taxas de crescimento (por exemplo, duplicações 1-3 por dia);
- d) crescimento em ambientes inóspitos, os quais não são agriculturáveis;
- e) utilização de fontes de nutrientes, tais como nitrogênio e fósforo, de uma variedade de fontes de águas residuais, contribuindo para o tratamento destas águas residuárias;
- f) sequestro de CO₂;
- g) produção de co-produtos de elevado valor agregado (por exemplo, biopolímeros, proteínas, polissacarídeos, pigmentos, alimentação animal, fertilizantes e H₂),
- h) crescimento em fotobiorreatores durante todo o ano com uma produção anual de biomassa com produtividade, com base na superfície, superior ao dos ecossistemas terrestres, por cerca de dez vezes (HU et al., 2008; WIJFFELS; BARBOSA, 2010; SCOTT et al., 2010).

2.1.2.3.1 Produção de bioetanol

O etanol é produzido pela fermentação de biomassa de diversas fontes, variando de plantas e resíduos de agroindustriais da agricultura (XUAN et al., 2009).

As microalgas são uma fonte potencial de substrato fermentável uma vez que, de acordo com as condições de crescimento, eles podem ter altos níveis de compostos de carbono

em sua composição, diretamente disponível para a fermentação ou após pré-tratamento. Pode-se produzir etanol a partir de várias microalgas: como *Chamydomonas sp.*, *Chlorella sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Cyanothece sp.* e *S. platensis* (UENO et al., 1998). Bactérias, leveduras ou fungos também são usados para fermentar carboidratos para produzir etanol em condições anaeróbias. No entanto, juntamente com o etanol, produzem outros compostos como CO₂ e H₂O, e o teor máximo é de 0,51 kg de etanol e 0,49 kg de CO₂ por kg de glicose (COSTA e MORAIS, 2011).

O princípio da produção de etanol por microalgas consiste em o cultivo de microorganismos, a colheita de células, preparação de fermentação da biomassa, e processo de extração do etanol. A preparação da biomassa pode ser realizada por meio de equipamento mecânico ou enzimas que quebram as paredes das células, tornando mais disponíveis os hidratos de carbono, bem como quebrar as grandes moléculas de carboidratos. Quando as células são quebradas, o fermento *Saccharomyces cerevisiae* é adicionado à biomassa e fermentação começa. Desta forma, o açúcar é convertido em etanol por leveduras (COSTA; MORAIS, 2011). O processo de destilação é usado para purificar o etanol (AMIN, 2009). O etanol produzido por microalgas pode ser purificado e usado como combustível e o CO₂ pode ser reciclado, usando-o como um nutriente para o cultivo de microalgas ou utilização de biomassa residual no processo de digestão anaeróbia (HARUN et al., 2010b apud COSTA e MORAIS, 2011).

A microalga *Chorella vulgaris* pode ser usada como uma fonte de etanol devido o seu alto teor de carboidratos com eficiência de conversão acima de 65% (COSTA e MORAIS, 2011). Ueno et al. (1998) obtiveram a máxima formação de etanol a partir de *Chlorella sp.* cultivada em 30°C de 448 µmol g⁻¹ em peso seco e quando a temperatura foi reduzida para 20°C a concentração de etanol foi 196 µmol g⁻¹ em peso seco. A produção de etanol diminuiu quando a temperatura foi aumentada para 35° C e foi completamente inibido em 45°C. A determinação da atividade enzimática em 35°C foi menor que em 25°C, indicando que as enzimas são ativadas em baixas temperaturas.

2.1.2.3.2 Produção de biodiesel

O uso contínuo de combustíveis originados de petróleo é agora amplamente reconhecido como insustentável uma vez que suas reservas são finitas e devido também a sua contribuição para o acúmulo de dióxido de carbono no ambiente. O biodiesel derivado de oleaginosas é uma alternativa renovável potencial, mas as microalgas parecem ser a única

fonte de biodiesel renovável que é capaz de atender a demanda global de combustíveis para transportes, uma vez que sua produtividade de óleo excede em muito a produtividade de óleo das culturas oleaginosas (CHISTI, 2007).

Existem diversas pesquisas no sentido de desenvolver biocombustíveis, uma fonte atraente de energia, haja vista, cada vez mais se faz necessário reduzir as emissões de carbono. Já são produzidos biocombustíveis a partir de cana-de-açúcar e oleaginosas como milho, soja, colza, palma e girassol, no entanto estas culturas necessitam de grandes quantidades terras agricultáveis e com o passar do tempo podem competir com a produção de culturas alimentares. Em virtude disso, nos últimos 2-3 anos a produção de biodiesel de microalgas tem tido um grande interesse, uma vez que a produtividade é bem mais elevada do que as plantas terrestres, podendo algumas delas acumular grandes quantidades de triacilgliceróis (SCOTT et al., 2010).

O Programa Nacional de Produção de Biodiesel vem incentivando a diversificação da matéria-prima para a produção de biodiesel. Entre as diversas matérias-primas para a produção de biodiesel, a biomassa de microalgas é aquela que apresenta a possibilidade de produção de biodiesel que permitirá a substituição total do diesel (cerca de 40 bilhões de litros por ano) e de modo ambientalmente sustentável (TEIXEIRA et al., 2010).

O biodiesel é um combustível derivado de óleos vegetais ou animais, normalmente composto de ésteres metílicos e ácidos graxos de cadeia longa e sua composição química depende da origem do petróleo. É geralmente produzido a partir da transesterificação química do óleo, onde a cadeia longa do glicerol é substituída por outra de álcool (SCOTT et al., 2010).

As microalgas produzem compostos poli-insaturados, o que leva à diminuição da estabilidade do biodiesel produzido, entretanto, devido à presença de ácidos graxos poli-insaturados, uma vantagem apresentada pelo biodiesel de microalgas é o alto rendimento em temperaturas baixas, característica que não é apresentada pelo biodiesel de oleaginosas convencionais, as quais apresentam pouco rendimento em temperaturas relativamente baixas (PÉREZ, 2007).

Os ácidos graxos que as microalgas produzem podem ser extraídos e convertidos em biodiesel, que é um combustível renovável, biodegradável, não tóxico e ambientalmente amigável (COSTA e MORAIS, 2011).

A produção de biodiesel a partir de microalgas entretanto, requer que a tecnologia de produção destes micro-organismos seja escalonada em três vezes com custos cerca de 10 vezes menores. Para tanto, a implementação de reatores, a utilização de fontes de nitrogênio e

fósforo de baixo custo, o desenvolvimento de conhecimento acerca das rotas metabólicas de acúmulo de lipídios baseados na biologia molecular são fatores imprescindíveis (WIJFFELS; BARBOSA, 2010). Ainda, a implementação dos métodos de extração de lipídios, utilizando menor quantidade de solventes com a diminuição da extração de impurezas como a clorofila, são etapas a serem otimizadas (SCOTT et al., 2010).

2.1.2.4 Produção do biosurfactantes

Os surfactantes são compostos anfipáticos, que possuem um grupo hidrofílico (polar) e um grupo hidrofóbico (apolar), que são geralmente hidrocarbonetos. Esses grupos normalmente têm diferentes graus de polaridade e ligações de hidrogênio, tendendo a distribuir-se nas interfaces entre as fases fluidas ocasionando interação água/óleo ou óleo/água, proporcionando a formação de um filme molecular que reduz a tensão superficial e interfacial. Essas características dão aos surfactantes propriedades únicas como: detergência, capacidade de dispersão de fases, emulsificação, formação de espuma, lubrificação, molhabilidade e solubilização. São sintetizados a partir do petróleo (DESAI e BANAT, 1997; NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Já os biosurfactantes são compostos tensoativos que são produzidos extracelularmente ou como parte da membrana celular de micro-organismos como bactérias, fungos e leveduras (MULLIGAN, 2005) e que apresentam as mesmas características surfactantes dos produzidos sinteticamente, tais como diminuição da tensão superficial e alta capacidade emulsificante (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Os biosurfactantes possuem em sua estrutura uma porção hidrofílica composta de aminoácidos ou peptídeos ânions ou cátions, mono, di ou polissacarídeos e uma porção hidrofóbica constituída de ácidos saturados, insaturados e ácidos graxos hidroxilados ou alcoóis graxos (DESAI e BANAT, 1997) de cadeias longas (MUTHUSAMY et al., 2008).

A composição lipídica da biomassa microalgal é composta tipicamente por glicerol, açúcares ou bases esterificadas e ácidos graxos contendo entre 12 e 22 carbonos, podendo ser tanto saturados, quanto mono ou poli-insaturados. Nas microalgas, os ácidos graxos correspondem a maior fração dos lipídios e, em algumas espécies, os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) representam entre 25% e 60% dos lipídios totais (BECKER, 1988; BROWN, 1991; BECKER, 2004 apud DERNER, 2006).

Os lipídios microalgais podem ser classificados em lipídios neutros e polares, sendo os polares os glicolipídios e fosfolipídios. Estruturas semelhantes, quando produzidas por

fungos, leveduras e bactérias, tem se apresentado como biossurfactantes ativos. Entretanto, não há relatos na literatura, da caracterização dos lipídios microalgais com relação à sua atividade surfactante.

2.1.3 Condições de cultivo

O crescimento de uma população de microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, químicos e físicos (RAVEN et al., 2005). Os fatores biológicos referem-se às próprias taxas metabólicas da espécie cultivada, quanto aos fatores físico-químicos, os principais que afetam o crescimento das microalgas são luz, temperatura, pH, salinidade e disponibilidade de nutrientes, estes são que demandam maior estudo. Não existe um meio de cultivo único para todas as espécies de microalgas, uma vez que cada uma tem suas necessidades específicas (RICHMOND, 2004).

O metabolismo principal da *Spirulina platensis* é a fotossíntese, sendo a luz solar, sua principal fonte de energia. Por meio da fotossíntese, converte os nutrientes em matéria celular e libera oxigênio. Os nutrientes de que necessita são uma fonte de carbono, nitrogênio, fósforo, potássio, ferro e outros oligoelementos (VONSHAK, 1997).

A *Spirulina sp.* é um micro-organismo mixotrófico. Na ausência de luz, pode utilizar compostos orgânicos de carbono como fonte energia. Dependendo das condições de crescimento, podem crescer quer fotoautotroficamente (fonte de energia: luz, fonte de carbono: CO₂), heterotroficamente (fonte de energia e carbono: glicose) ou mixotroficamente (fonte de energia: luz e glicose, fonte de carbono: glicose e CO₂). (MARQUEZ-ROCHA et al. 1993).

Em crescimento mixotrófico, o CO₂ pode ser tratado como produto metabólico intermediário. É gerado pelo processo contributivo heterotrófico e simultaneamente consumido por meio caminho fotoautotrófico. Simultaneamente O₂ é produzido por meio do caminho fotoautotrófico e consumido pelas reações heterotróficas (CHOJNACKA e ZIELINSKA, 2012).

O cultivo mixotrófico possui inúmeras vantagens, dentre elas o aumento da produtividade da biomassa, trabalhando em altas concentrações de células e facilidade para manter condições de crescimento ótimas (CHEN, 1996).

2.1.3.1 Luz

A luz constitui um fator fundamental no cultivo de microalgas fotoautotróficas, tanto para si como para suas inter-relações com outros parâmetros (ABALDE et al., 1995). A quantidade de energia luminosa recebida pelas células irá repercutir na quantidade de carbono fixado, uma vez que assimilam carbono inorgânico para conversão em matéria orgânica, sendo a luz a fonte de energia que é essencial para esta reação, o que influencia consequentemente na produção de biomassa e na taxa de crescimento das culturas microalgais. A radiação utilizada fotossinteticamente está dentro da região do espectro visível (400 nm a 700 nm) que representa a fonte de energia para a fotossíntese. Tanto a intensidade luminosa, como o comprimento de onda e o fotoperíodo influenciam no crescimento e no metabolismo das microalgas (LIPS, 1986; VILLAÇA, 2010).

É necessário uma certa intensidade de luz para que seja possível a realização da fotossíntese. As intensidades de luz muito elevadas frequentemente são inibitórias para o crescimento de microalgas produzindo fotoinibição. A fotoinibição ou fotoinativação pode definir-se como a diminuição da capacidade fotossintética em elevadas intensidade de luz, muito acima dos valores de saturação, ou seja, muito superiores as requeridas para obter a taxa máxima de fotossíntese (ABALDE et al., 1995).

A velocidade de crescimento da *Spirulina* pode sofrer uma diminuição à medida que ocorre seu desenvolvimento, devido ao sombreamento (MYERS e BORR, 1940) provocado pelas próprias células, impedindo que parte da cultura receba a incidência da luz. A agitação da cultura pode ser um fator decisivo na velocidade de crescimento possibilitando uma absorção homogênea da luz pelas células (RICHMOND, 1990).

No crescimento fotoautotrófico, as microalgas utilizam a luz como a única fonte de energia para impulsionar a fotólise. A energia produzida nesta reação é utilizada para a redução de CO₂. Em condições heterotróficas, energia necessária de crescimento é alimentada por meio da respiração com o uso de fonte de carbono orgânico, com o substrato. Nestes dois casos, diferentes fontes de energia são utilizados. Isto significa que diferentes processos metabólicos ocorrem. No metabolismo mixotrófico, ambos os processos: fotoautotrófico e heterotrófico, ocorrem simultaneamente dentro de uma única célula (CHOJNACKA, 2003; MARQUEZ-ROCHA et al. 1993).

2.1.3.2 Temperatura

A temperatura ótima para o cultivo de *Spirulina* é na faixa de 35 °C a 38 °C. Muitas cepas de *Spirulina* diferem em sua temperatura ótima de crescimento, assim como sua sensibilidade aos extremos de temperatura. Desvios do ótimo de temperatura, em torno de 35°C têm efeito inibitório na capacidade fotossintética. Estudos demonstram que culturas crescendo a temperaturas menores que a temperatura ótima são mais sensíveis a fotoinibição (VONSHAK, 1997).

A temperatura afeta a composição, as taxas metabólicas e o crescimento celular das microalgas. No entanto, a resposta à temperatura de crescimento varia de espécie para espécie. O aumento da temperatura da cultura microalgal causa um aumento no teor de proteínas e uma diminuição nos teores de carboidratos e lipídios das células. Além disso, com um aumento de temperatura muitas espécies de microalgas diminuem os percentuais de ácidos graxos insaturados e aumentam os percentuais dos ácidos graxos saturados da fração lipídica (ABALDE et al., 1995; RENAUD et al., 2004).

Colla et al. (2004) desenvolveram um estudo em que testaram a influência da temperatura e da concentração de nitrato de sódio (NaNO₃). Verificaram que temperatura foi o fator mais importante e que a maior quantidade de ácido gama-linolênico (GLA) foi obtida a 30°C, e o perfil dos ácidos graxos da *Spirulina* cultivada mostrou que foram mais prevalentes (em ordem de abundância) palmítico, linoleico e os ácidos linoleicos.

2.1.3.3 pH

As microalgas mostram uma clara dependência a respeito do pH do meio de cultivo e diferentes espécies variam amplamente sua resposta ao mesmo. Cada microalga apresenta um pH ótimo para seu cultivo. A diminuição do pH pode ser letal, enquanto podem suportar melhor um aumento de pH, até um certo limite (RICHMOND, 1990; ABALDE et al., 1995). Segundo Tomaselli (1997) as *Spirulinas* são cianobactérias planctônicas que habitam em corpos de água tropical e subtropical caracterizados por elevados níveis de carbonato e bicarbonato e pH elevado (até 11).

O pH do meio de cultivo determina a solubilidade do CO₂ e dos minerais, assim como a distribuição relativa das formas inorgânicas de carbono e influi direta e indiretamente no metabolismo das microalgas (ABALDE et al., 1995).

A cianobactéria *Spirulina* apresenta marcado aumento na taxa de fotossíntese para pH na faixa de 8,0 a 10,0; desde que nessa faixa o íon bicarbonato seja predominante como fonte de carbono dissolvido. O pH do meio de crescimento afeta a dissociação de vários sais e tem efeito marcado na solubilidade de muitos metais. Um aumento no pH acima da faixa ótima de crescimento pode implicar na deficiência de alguns elementos traços que provoca a lise celular. Outro problema verificado com pH superior 10,5 é que ocorre precipitação de CaCO_3 (VONSHAK, 1997). Segundo Pelizer et al. (2002) e Andrade e Costa (2008), a faixa ótima de pH para o crescimento da microalga *Spirulina* é de 9,5 a 10,5.

2.1.3.4 Mistura e aeração

O processo de mistura de uma suspensão microalgal é importante, pois permite que as células fiquem suspensas no meio, melhora a eficiência da utilização da luz, favorece a troca de gases, impede a estratificação térmica e ainda auxilia na distribuição homogênea dos nutrientes (SUH; LEE, 2003).

Os cultivos de microalgas, quando realizados em escala laboratorial, podem ser misturados com o auxílio de um “shaker”, ou através de aeração. A aeração é feita com injeção de ar (atmosférico ou enriquecido com CO_2), através de mangueiras de silicone, no fundo do frasco contendo a suspensão microalgal. Nos cultivos em grande escala, a mistura é feita de diferentes formas, que dependem da estrutura do tipo de sistema utilizado. Tanques pequenos, geralmente localizados em ambiente coberto, podem ser agitados por aeração, mas para tanques grandes a aeração não é suficiente para assegurar uma distribuição uniforme das células (LOURENÇO, 2006).

2.1.3.5 Salinidade

A concentração de sais inorgânicos dissolvidos, tanto em águas doces como em águas marinhas, pode afetar o crescimento das microalgas em função de sua atividade osmótica. A tolerância ao sal varia de acordo com as espécies, algumas só toleram concentrações milimolares de sal, enquanto outras sobrevivem em soluções saturadas. O que é um estresse salino letal para um grupo pode ser facilmente tolerado por outro grupo (ABALDE et al., 1995). Isso pode ser verificado no estudo desenvolvido por Takagi et al. (2006) no qual promoveram estresse salino a partir do aumento da concentração de NaCl em meios de cultivo

de células de *Dunaliella*, e nessas células, observaram um aumento de 70% no teor de lipídios.

2.1.3.6 Requerimentos nutricionais

Para um crescimento ótimo, deve-se administrar aos cultivos nutrientes em quantidades adequadas. Há muitas variações de requerimentos (em quantidades) entre as diferentes espécies e dentro de cada espécie variam em função das diferentes condições ambientais, como luz, temperatura e pH (ABALDE et al., 1995).

2.1.3.6.1 Fonte de nitrogênio

O nitrogênio é um dos principais elementos para o desenvolvimento microalgal, podendo ser assimilado através de várias fontes, como N_2 , NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- , uréia, aminoácidos, purinas e pirimidinas. Os sais de nitrato, sais de amônio e de uréia são as fontes mais empregadas em cultivos artificiais. Se o suprimento de nitrogênio é abundante em cultivos, verifica-se tendência do aumento nas concentrações de proteínas e clorofila nas células. Contrariamente, quando as concentrações de nitrogênio são baixas, verifica-se uma diminuição marcante da taxa de divisão celular, além da redução das concentrações de proteínas e clorofila (LOURENÇO, 2006).

A depleção de nitrogênio pode aumentar o conteúdo lipídico de uma microalga. Isso é explicado pelo fato de que a falta de nitrogênio direciona o metabolismo microalgal, antes voltado à multiplicação celular, para a produção de componentes de reserva, como os ácidos graxos saturados, para preparar a célula para um período de privação. Isso foi verificado no estudo proposto por Alonso et al. (2000), no qual testaram a influência da idade dos cultivos e da concentração de nitrogênio sobre a distribuição de ácidos graxos entre diferentes classes de lipídios na microalga *Phaeodactylum tricorutum*, sendo verificado que a idade das culturas não afeta o perfil dos ácidos graxos. O acúmulo de lipídios aumentou significativamente quando a concentração de nitrogênio foi diminuída, os lipídios neutros tiveram um aumento entre 73% e 79%, os fosfolipídios entre 6% e 8% e o maior incremento foi observado nos triacilgliceróis, que foi de 69% para 75% .

Macedo e Alegre (2001) também testaram no cultivo de *Spirulina* o fornecimento de nitrogênio em níveis normais, níveis limitados (reduzidos) e ausência do nutriente. Observaram o aumento médio de três vezes o conteúdo de lipídios totais em condições

limitantes do nutriente, visando a produção de uma biomassa rica em lipídios e ácidos graxos poli-insaturados essenciais.

2.1.3.6.2 Fonte de carbono

O carbono é o elemento necessário em maiores concentrações para as algas por ser constituinte de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células (proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas, lipídios, entre outros) (LOURENÇO, 2006) e constituir cerca de 50% da biomassa seca (DERNER, 2006).

A fotossíntese é a principal rota de fixação do carbono, entretanto algumas espécies (incluindo o gênero *Arthrospira*) permitem a combinação entre a fotossíntese e a assimilação heterotrófica de compostos orgânicos, num processo chamado mixotrofia. Tal processo possibilita que o crescimento das microalgas não seja estritamente dependente da intensidade de luz nos cultivos permitindo o uso de variadas fontes desse nutriente, dependendo da aplicação da biomassa produzida e dos recursos disponíveis (CHOJNACKA; NOWORYTA, 2004).

O carbono é o elemento necessário em maiores quantidades para algas, pois constitui em torno de 50% da biomassa seca. Pode estar na forma inorgânica, como o CO_2 e compostos derivados (H_2CO_3 , HCO_3^- , ou CO_3^{2-}), sendo proveniente do ar atmosférico ou de ar injetado na cultura, ou na forma orgânica, como a glicose, acetato, lactato e aminoácidos. Algumas microalgas autotróficas só assimilam o carbono inorgânico, que se difunde da água para o interior das células e é usado em vários processos metabólicos, como a fixação do próprio carbono. Algumas microalgas também podem assimilar outras fontes de carbono e, quando a microalga consegue assimilar o CO_2 e carbono orgânico simultaneamente, pode-se chamar esse cultivo de mixotrófico (CERÓN GARCIA et al., 2000).

Alguns autores reportam um aumento da biomassa seca e aumento da produção de lipídios pela microalga *Phaeodactylum tricorutum* utilizando fontes de carbono como extrato de centeio, trigo ou batata (FÁBREGAS, 1996), glicose e glicerol (CERÓN GARCIA et al., 2000). Por exemplo, Cerón García e colaboradores (2000) adicionaram glicerol ao meio durante o cultivo dessa microalga e obtiveram uma produção de biomassa seca 74% maior do que um controle sem esse composto e ainda um percentual de lipídios por biomassa seca 3 vezes maior do que o controle sem glicerol.

O CO_2 é a fonte de carbono que é mais fácil assimilada pelas microalgas, uma vez que se difunde rapidamente (difusão passiva) da água para o interior das células e é usado

diretamente nos processos de fixação. Já o bicarbonato, é incorporado ativamente, gerando um gasto energético para suportar este processo (DERNER, 2006).

O bicarbonato é a fonte de carbono mais frequentemente empregada em meios de cultura. Segundo Pinho (2009) o gênero *Arthrospira* necessita de grandes quantidades de bicarbonato, que além de fonte de carbono, auxilia na manutenção da condição alcalina do meio de cultura, vital para o cultivo deste gênero, e constitui uma barreira para o desenvolvimento de outros micro-organismos.

2.1.3.6.3 Fonte de ferro

No ambiente natural, muitas vezes a baixa biodisponibilidade de ferro limita o crescimento microalgal, já que o ferro é um importante cofator em vários processos bioquímicos, como, por exemplo, na redução de nitrato, nitrito e sulfato, na via biossintética da clorofila e dos citocromos, na fotossíntese e na cadeia de transporte de elétrons, na fixação de nitrogênio molecular e na detoxificação de espécies reativas de oxigênio (LOURENÇO, 2006).

O ferro ocorre em várias formas químicas, sendo que o Fe^{2+} é mais solúvel que o Fe^{3+} em meio aeróbico e pH neutro a alcalino. Os micro-organismos não têm capacidade de assimilar o ferro na sua forma iônica, mas sim na forma ligada a agentes quelantes, como o EDTA ou substâncias húmicas, que tornam o ferro biodisponível (LOURENÇO, 2006).

Liu, Wang e Zhou (2008) investigaram a influência da concentração de ferro durante os cultivos para o acúmulo de lipídios na microalga *Chlorella vulgaris* e demonstraram que a adição de ferro prolongou a fase exponencial quando adicionado quando a alga havia quase chegado à fase estacionária. Mostraram ainda que a suplementação de ferro no início do cultivo causa uma diminuição do crescimento celular, mas estimula a produção de lipídios neutros em 56,6% quando comparada a produção com um padrão, sem suplementação de ferro.

Hanna e colaboradores (2012) estudaram a influência da suplementação de CO_2 e Fe^{+3} em diferentes concentrações em cultivos de *Scenedesmus obliquus*. Neste estudo observaram que o acúmulo de lipídios totais e a produtividade de lipídios totais mostram uma tendência crescente, sendo que esses lipídios apresentaram um perfil de ácido graxo adequado a produção de biodiesel.

2.1.3.6.4 Fonte de fósforo

O fósforo tem funções importantes nas células microalgais, estando diretamente envolvido na transferência de energia e constituição de moléculas de ATP, açúcares, fosfatados, ácidos nucleicos e fosfoenzimas. Pode ser adicionado no meio de cultivo na forma de fósforos e polifósforos. A deficiência de fósforo limita o perfil lipídico da célula. De forma que o metabolismo celular é direcionado a produção de triglicérides saturados e lipídios neutros, diminuindo também a produção de ácidos graxos poli-insaturados (LOURENÇO, 2006).

2.1.3.6.5 Outros nutrientes

O silício é adicionado em meios de cultura na forma de sais de silicato de sódio hidratado. Apenas as microalgas pertencentes à classe das diatomáceas e silicoflagelados necessitam de silício em altas concentrações, pois somente estas microalgas têm o silício como um componente de suas estruturas de revestimento externa. As diatomáceas têm uma demanda tão alta por silício quanto de nitrogênio, recomendando-se uma proporção igual desses dois elementos. Em situações de limitação por silício, verifica-se uma diminuição da espessura da parede celular dessas algas (LOURENÇO, 2006).

O sódio, potássio e cloro são universalmente requeridos pelas microalgas, atuando o sódio e potássio como ativadores de enzimas, enquanto que o cloro é fundamental para a fotossíntese. Os requerimentos de sódio para cianobactérias marinhas, geralmente excedem aqueles necessários para a espécie de água doce (RICHMOND, 1990).

Os micronutrientes são nutrientes necessários em pequenas quantidades para o crescimento das microalgas, mas essenciais, pois são parte de moléculas essenciais, e fatores de crescimento de enzimas, também são necessários para ativação das mesmas. Normalmente são necessários como micronutrientes o Fe, o Mn, o Cu, o Mo e o Co (ABALDE et al., 1995). Os micronutrientes incluem vários metais traço e as vitaminas tiamina (B1), cianocobalamina (B12) e às vezes biotina (VILLAÇA, 2010).

2.1.4 Perfil lipídico das microalgas

A quantidade de lipídios de uma célula microalgal varia de 1% a 70% da biomassa seca, mas pode alcançar até 90% sob determinadas condições para algumas espécies (MENG

et al., 2008; MOROCHO-JÁCOME et al., 2010), sendo que na *Spirulina platensis* o percentual médio de lipídios é de 6 % a 13% da massa seca, podendo às vezes atingir até 15% (BELAY, 2002; COHEN, 1997; DILLON et al. 1995).

Segundo Alonso et al. (2000), o perfil lipídico das microalgas altera-se com a fase do ciclo de crescimento em que o cultivo se encontra: exponencial ou estacionária. Os lipídios neutros são mais abundantes em células na fase estacionária, já os lipídios polares e os lipídios poli-insaturados são mais abundantes na fase exponencial do cultivo.

Um estudo desenvolvido por Grima et al. (1994) oportunizou o desenvolvimento de um modelo matemático para o crescimento de microalgas em quantidade de luz limitada. Nesse estudo verificou-se que a mudança do perfil lipídico com a idade dá-se pela quantidade de nutrientes e luminosidade. Em condições de disponibilidade de nutrientes, a tendência do cultivo é possuir um maior número de células gerando uma maior competição nutricional e menor disponibilidade de luz. Sob essa condição, a microalga é obrigada a ativar um aparato fotossintético mais complexo e passa a sintetizar mais lipídios polares para fazer parte das membranas dos cloroplastos. Na fase exponencial do cultivo, as células jovens tendem a captar mais nitrogênio pela alta disponibilidade deste nutriente no meio, produzindo, assim, mais lipídios polares. Quando há diminuição de nutrientes e uma alta concentração de células, a captação de nitrogênio e fósforo diminui, as células param de se multiplicar e o cultivo entra na fase estacionária. A partir daí a célula passa a utilizar fontes de carbono orgânico ou inorgânico, quando disponíveis, para manutenção do seu metabolismo e para produção de lipídios de reserva.

As microalgas podem sintetizar duas classes principais de lipídios:

- a) lipídios neutros (mono, di e triacilgliceróis);
- b) lipídios polares (fosfo, glico e galactolipídios).

Esses lipídios são produzidos a partir das fontes de carbono fornecidas a microalga, sejam elas orgânicas, como a glicose, acetato ou glicerol, ou inorgânicas como o dióxido de carbono (CO₂) (HUANG et al., 2010).

2.2. BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes são compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, e consistem em sub-produtos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras. Podem ser produzidos extracelularmente ou como parte da membrana celular desses micro-organismos.

2.2.1 Definição e caracterização

Os surfactantes são compostos anfipáticos, que possuem um grupo hidrofílico (polar) que pode ser iônico, não iônico ou anfotérico e um grupo hidrofóbico (apolar), que são geralmente hidrocarbonetos. Esses grupos normalmente têm diferentes graus de polaridade e ligações de hidrogênio, tendendo a distribuir-se nas interfaces entre as fases fluidas ocasionando interação água/óleo ou óleo/água, proporcionando a formação de um filme molecular que reduz a tensão superficial e interfacial. Essas características dão aos surfactantes propriedades únicas como: detergência, capacidade de dispersão de fases, emulsificação, formação de espuma, lubrificação, molhabilidade e solubilização. São sintetizados a partir do petróleo (DESAI e BANAT, 1997; NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes são compostos tensoativos que são produzidos extracelularmente ou como parte da membrana celular de micro-organismos como bactérias, fungos e leveduras (MULLIGAN, 2005) e que apresentam as mesmas características surfactantes dos produzidos sinteticamente, tais como diminuição da tensão superficial e alta capacidade emulsificante (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

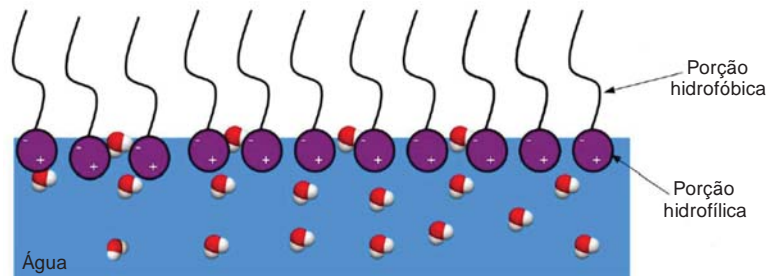
2.2.2 Funções fisiológicas

As funções fisiológicas dos biossurfactantes são ainda objeto de estudos, mas conforme Nitschke e Pastore (2002) já lhes são atribuídas funções significativas como: emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos e compostos insolúveis em água; transporte de hidrocarbonetos; aderência e liberação da célula a superfícies; atividade antibiótica.

A estrutura molecular de um surfactante irá influenciar o seu comportamento em interfaces. Ao descrever a superfície-ativa, é feito um esforço para a reflexão sobre as possíveis localizações teóricas e orientações dos biossurfactantes. No entanto, deve ser mantido em mente que a situação nos sistemas naturais é muito mais complexa e requer a consideração de muitos parâmetros adicionais (RODRIGUES et al., 2006)

Pode-se observar na Figura 1 a ação de um biossurfactante: ele se acumula entre as moléculas (interfaces) dos dois líquidos imiscíveis, reduzindo a superfície ar-líquido e a tensão interfacial líquido-líquido que reduz a repulsão entre as duas fases, permitindo a interação entre elas.

Figura 1. Acúmulo de biossurfactante nas interfaces líquido e ar



Fonte: PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011.

2.2.3 Classes de biossurfactantes

Os biossurfactantes possuem propriedades específicas, nas quais baseia-se para a sua classificação. São levados em consideração e avaliados: seu padrão de dissociação em água, sua composição química, peso molecular, propriedades físico-químicas, modo de ação e qual o micro-organismo de origem (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011; MAKKAR et al., 2011). Eles possuem em sua estrutura uma porção hidrofílica composta de aminoácidos ou peptídeos ânions ou cátions, mono, di ou polissacarídeos e uma porção hidrofóbica constituída de ácidos saturados, insaturados e ácidos graxos hidroxilados ou alcoóis graxos (DESAI; BANAT, 1997) de cadeias longas (MUTHUSAMY et al., 2008). Desta forma, as principais classes de biossurfactantes são: glicolipídios; lipopeptídios e lipoproteínas; ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios; surfactantes poliméricos e surfactantes particulados. Observa-se na Tabela 1 esta classificação, bem como os micro-organismos envolvidos.

Tabela 1. Principais classes de biossurfactantes e micro-organismos envolvidos

Tipo de Biossurfactante	Micro-organismos
Glicolipídios	
- ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
- soforolipídios	<i>Torolopis bambicola</i> <i>T. apícola</i>
- trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Mycobacterium SP.</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
- Peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
- Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- Serrawetina	<i>Serratina marcescens</i>
- Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
- Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídios neutros e Fosfolipídios	
- Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
- Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
- Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
- emulsan	<i>Acinobacter calcoaceticus</i>
- biodipersan	<i>Acinobacter calcoaceticus</i>
- liposan	<i>Cândida lipolytica</i>
- carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- manana-lipídio-proteína	<i>Cândida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
- vesículas	<i>Acinobacter calcoaceticus</i>
- células	<i>Variedades de bactérias</i>

Fonte: Adaptada DESAI; BANAT, 1997.

2.2.4 Propriedades dos biossurfactantes

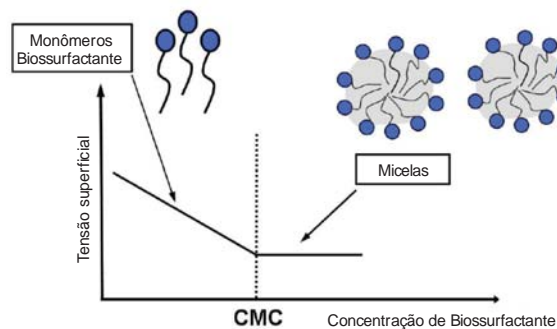
A eficiência de um surfactante é caracterizada pela sua capacidade tensoativa, ou seja, pela redução da tensão superficial. Biossurfactantes com baixa massa molecular apresentam maior eficiência na redução da tensão superficial, melhor propriedade tensoativa (glicolipídios, lipopeptídios, fosfolipídios); já biossurfactantes com alta massa molecular apresentam maior eficácia na estabilização de emulsões, melhor capacidade emulsificante (poliméricos e particulados) (ROSENBERG e ZON, 1999; ROSEN, 1978 apud MULLIGAN, 2005; MUTHUSAMY et al., 2008).

A tensão superficial ar/água e óleo/água pode ser medida por meio de medidas de tensão superficial. A tensão superficial da água destilada é de 72 mN/m, quando adicionado o surfactante, esse valor é reduzido para 30 mN/m (DESAI; BANAT, 1997). Caracterizando assim, a atividade interfacial e superficial dos biossurfactantes, e atribuindo-lhes qualidades

de eficiência e efetividade, uma vez que produzem menor tensão superficial com menores concentrações de biossurfactantes (COOPER et al, 1981).

Outra propriedade importante dos biossurfactantes é a formação de micelas, estruturas que permitem a redução da superfície e a tensão superficial, maior solubilidade, bem como biodisponibilidade com compostos orgânicos hidrofóbicos (WHANG, 2008). A formação das micelas, bem como bicamadas e vesículas, são observadas quando adicionadas concentrações crescentes de surfactantes em uma solução água/óleo ou óleo/água, fazendo com que a redução da tensão superficial entre as moléculas seja observada até um nível crítico (CMC) concentração micelar crítica, ponto onde ocorrem a formação dessas estruturas (DESAI e BANAT, 1997; BECHER, 1965 apud MULLIGAN, 2005). Observa-se na Figura 2 como a concentração de biossurfactante reduz a tensão superficial, até a CMC (concentração micelar crítica) que consiste na concentração mínima de surfactante requerida para alcançar os valores mais baixos de tensão interfacial ou de tensão superficial (LIN, 1996). A partir dessa concentração os surfactantes se associam em estruturas como micelas, vesículas ou lamelas e não ocorrerá maior redução na tensão superficial ou interfacial (MAIER, 2003).

Figura 2. Relação: Concentração de biossurfactante, tensão superficial e formação de micelas



Fonte: PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011.

Outras propriedades importantes são características dos biossurfactantes, uma vez que são produzidos por micro-organismos, apresentam biodegradabilidade, o que permite utilização em processos de biorremediação; apresentam menor toxicidade, o que permite sua utilização na produção de alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos. Observa-se também tolerância a temperatura, apresentando atividade característica em temperaturas extremas e pH

(DESAI e BANAT, 1997; KITAMOTO et al., 2002; NITSCHKE e PASTORE, 2002; MULLIGAN, 2005).

2.2.5 Micro-organismos produtores de biossurfactantes

Os biossurfactantes têm sido foco de muitos estudos nas últimas décadas, mas ainda não se conseguiu aperfeiçoar métodos para que seu rendimento seja alto e seus custos reduzidos para utilização em escala industrial, uma vez que os custos com recuperação e purificação são elevados e a maioria das matérias-primas são 10-30 vezes o custo total da produção para a maioria dos processos biotecnológicos (MUTHUSAMY et al., 2008) . Estudos com matérias-primas mais baratas têm sido realizados, foram sintetizados biossurfactantes a partir de substratos renováveis (DESAI E BANAT, 1997; SYLDATK E HAUSMANN, 2010) tais como: água de lavagem de mandioca (NITSCHKE E PASTORE, 1990); melão (PATEL; DESAI, 1997 apud MUTHUSAMY et al., 2008; BEZERRA, 2006); gordura animal (DESPHPANDE; DANIEL, 1995 apud MUTHUSAMY et al. 2008); melão, manipueira, soro de leite (NITSCHKE; PASTORE, 2003); óleo vegetal de pequi (BARBOSA; PAZ, 2007); manipueira (BARROS et al., 2008); reutilização de óleo de fritura (CHA et al., 2008); polpa de figo da índia (SANTANA et al., 2009); milhocina e óleo queimado (SILVA et al., 2010).

A Tabela 2 apresenta mais organismos produtores de biossurfactantes, bem como seu tipo e potenciais aplicações.

Tabela 2. Biossurfactantes, organismos produtores e suas aplicações nos últimos anos

Organismo	Tipo de biossurfactante	Potenciais aplicações	Referência
<i>Rhodococcus erythropolis</i> 3C-9	Glicolipídio e trealose	Óleo de operações de limpeza do derramamento	(Peng et al. 2007)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S2	Ramnolipídio	Biorremediação de locais contaminados com óleo	(Chen et al. 2007)
<i>Pseudozyma stamensis</i> CBS 9960	Mannosylerythritol lipídio	Biossurfactante promissor de leveduras	(Morita et al. 2008a)
<i>Pseudozyma graminicola</i> CBS 10092	Mannosylerythritol lipídio	detergentes de lavar roupa	(Morita et al. 2008b)
<i>Pseudomonas libanensis</i> M9-3	Lipopeptídeo	Aplicações ambientais e biomédicas	(Saini et al. 2008)
<i>Bacillus subtilis</i> strain ZW-3	Lipopeptídeo	Potencial em produtos farmacêuticos, protecção ambiental, recuperação de óleo cosmético	(Wang et al. 2008b)
<i>Rhodococcus</i> sp. TW53	Lipopeptídeo	Biorremediação de poluição marinha por petróleo	(Peng et al. 2008)
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	Glicolipídio	Biorremediação de poluição marinha por petróleo	(Fukuoka et al. 2008)
<i>R. wratislaviensis</i> BN38	Glicolipídio	Aplicações de biorremediação	(Tuleva et al. 2008)
<i>Bacillus subtilis</i> BS5	Lipopeptídeo	Biorremediação de locais contaminados com hidrocarbonetos	(Abdel-Mawgoud et al. 2008)
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Lipopeptídeo	Aplicações ambientais	(Thavasi et al. 2008b)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BS20	Ramnolipídio	Biorremediação de locais contaminados com hidrocarbonetos	(Abdel-Mawgoud et al. 2009)
<i>Micrococcus luteus</i> BN56	Trealose tetraester	Biorremediação de ambientes contaminados com óleo	(Tuleva et al. 2009)
<i>Bacillus subtilis</i> HOB2	Lipopeptídeo	Recuperação avançada de petróleo, biorremediação de solo e ambientes marinhos, e as indústrias de alimentos	(Haddad et al. 2009)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614	Ramnolipídio	Biorremediação	(Neto et al. 2009)
<i>Nocardopsis alba</i> MSA10	Lipopeptídeo	Biorremediação	(Gandhimathi et al. 2009)
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. PNK-04	Ramnolipídio	Aplicações ambientais	(Nayak et al. 2009)
<i>Pseudozyma parantarctica</i>	Mannosylmannitol lipídio	Emulsificantes e / ou detergentes de lavar roupa	(Morita et al. 2009)
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Ramnolipídio	Aplicações ambientais	(Oliveira, et al. 2009)
<i>Pseudomonas koreensis</i>	Lipopeptídeo	Agente de controle biológico	(Hultberg et al. 2010)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> BD5	Lipopeptídeo	Biorremediação e biomedicina	(Janek et al. 2010)
<i>Candida bombicola</i>	Sofrolipídios	Aplicações ambientais	(Daverey and Pakshirajan 2010a, b)
<i>Brevibacterium aureum</i> MSA13	Lipopeptídeo	MEOR	(Kiran et al. 2010b)
<i>Nocardopsis lucentensis</i> MSA04	Glicolipídio	Biorremediação no ambiente marinho	(Kiran, et al. 2010a)
<i>Bacillus velezensis</i> H3	Lipopeptídeo	Tensão industrial para a produção lipopeptídeos	(Liu et al. 2010)
<i>Calyptogenia soyvae</i>	Mannosylerythritol lipídio	Processos de biorremediação no ambiente marinho	(Konishi et al. 2010)
<i>Burkholderia plantari</i> DSM 9509	Ramnolipídio	Detergentes e indústria farmacêutica	(Hörmann et al. 2010)

Fonte: MAKKAR et al., 2010

2.2.6 Aplicações ambientais dos biossurfactantes

2.2.6.1 Recuperação melhorada do petróleo (MEOR)

Segundo Banat (1995), a recuperação melhorada do petróleo (MEOR) consiste em uma tecnologia que utiliza micro-organismos e produtos do seu metabolismo para a recuperação de terciária de óleo residual. Os micro-organismos produzem surfactantes que reduzem a tensão superficial óleo-rocha, reduzindo as forças capilares que impedem a movimentação do óleo através dos poros da rocha, e também auxiliam na emulsificação e na quebra dos filmes de óleo das rochas.

A MEOR ainda trata-se de uma tecnologia cara, uma vez que a produção de biossurfactantes por micro-organismos necessita o uso de substratos caros, tornando seu rendimento limitado. São necessários mais estudos também na utilização de micro-organismos, uma vez que alguns ainda são patogênicos ou ainda difíceis de lidar em grande escala, dificultando sua utilização na indústria (SYLDATK e HAUSMANN, 2010).

2.2.6.2 Biorremediação de petróleo

A biorremediação de petróleo consiste em processos biológicos para recuperação de áreas contaminadas com petróleo. Tecnologia esta que utiliza micro-organismos capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono. Esses micro-organismos são capazes de degradar vários tipos de hidrocarbonetos: de cadeia curta, longa, e ainda numerosos compostos aromáticos. Todos esses compostos são insolúveis em água (BANAT, MAKKAR e CAMEOTRA, 2000; MATSUURA, 2004).

Os micro-organismos produzem biossurfactantes degradantes de hidrocarbonetos de diversificada natureza química, e tamanho molecular. Estes compostos de superfície-ativa aumentam a superfície hidrofóbica de substratos insolúveis em água e aumentam a sua biodisponibilidade, aumentando assim o crescimento de bactérias e a taxa de biorremediação (RON; ROSENBERG, 2002; PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011).

2.2.6.3 Biorremediação de solos contaminados por metais

A contaminação do solo por metais pesados é muito prejudicial a todos os seres vivos. E tem sido foco de muitos estudos. Os metais devido à sua natureza extremamente tóxica, mesmo em pequenas concentrações no solo podem acarretar consequências graves.

Na atualidade existem muitas técnicas utilizadas para descontaminar solos contaminados com metais pesados. A remediação de solos inclui esses métodos não biológicos, como escavação e disposição do solo contaminado para aterros ou técnicas biológicas (ASÇI et al., 2010). Os métodos biológicos são os processos que as plantas utilizam (fitorremediação) ou micro-organismos (biorremediação) para remover os metais do solo. Os metais pesados não são biodegradáveis, eles só podem ser transferidos de um estado para outro, que muda a sua mobilidade e toxicidade. Os micro-organismos podem influenciar metais de várias maneiras: algumas formas de metais podem ser transformados, quer por processos redox ou por alquilação. Os metais também podem ser acumulados por micro-organismos pelo metabolismo independente (passiva) ou por metabolismo dependente, absorção intracelular (ativa). Os micro-organismos podem influenciar a mobilidade do metal, afetando indiretamente o pH ou por produção ou liberação de substâncias que alteram a mobilidade dos metais (BRIUNS, 2000; LEDIN, 2000 apud PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011).

Existem diversos métodos envolvidos na biorremediação de solos contaminados por metais, dois deles são: “lavagem de solo” e “descarga de solo”. A lavagem do solo é uma técnica utilizada *ex-situ*. O solo é escavado, colocado em uma coluna de vidro e lavado com uma solução de biossurfactante. Já a “descarga de solo” é uma tecnologia “*in situ*” e envolve a utilização de tubos de drenagem e valas para a introdução e recolha da solução de biossurfactante para o solo (HERMAN et al. 1995 apud PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011; SINGH e CAMEOTRA, 2004), nesse processo, o biossurfactante é aplicado a uma pequena parte de solo contaminado em um misturador. O composto é agitado, formando o complexo metal-biossurfactante e depositado de volta, para decantação, então ocorre a precipitação do biossurfactante com o metal adsorvido. O vínculo formado entre o metal de carga positiva e carga negativa do surfactante é tão forte que a água da lavagem do solo remove o complexo de metal-biossurfactante a partir da matriz do solo. Esse método também pode ser realizado para a contaminação do subsolo mais profundo apenas com mais atividades de bombeamento (PACWA-PLOCINACZAK et al., 2011).

2.3 BIORREMEDIAÇÃO

Os processos biológicos são uma tecnologia promissora para a remoção de contaminantes e sobressaem-se por serem fundamentados em métodos naturais e relativamente simples, sendo menos agressivos e mais adequados para a manutenção do equilíbrio ecológico, além do baixo custo quando comparados às outras alternativas (BENTO et al., 2005, MATHEW et al., 2006).

O conceito de biorremediação pode sofrer algumas alterações de acordo com o autor, no entanto de uma forma geral é um processo que se baseia em reações químicas realizadas por microrganismos sobre contaminantes presentes no ambiente natural. Essa ação microbiana é capaz de modificar ou decompor o composto original em formas mais simples, menos tóxicas ou atóxicas, sendo a mineralização do contaminante o benefício máximo alcançado nesse processo (SEMPLE et al., 2001). Corseuil (1994) cita que a meta final para biorremediação é a conversão de resíduos orgânicos em biomassa e sub-produtos inertes do metabolismo microbiano como o CO₂, CH₄ e sais orgânicos.

A biorremediação engloba uma série de tecnologias e técnicas distintas para tratamento não só de solos, mas também de águas contaminadas e outros resíduos, que podem ser classificadas em processos de tratamento *in-situ* ou *ex-situ*. Nos processos *in situ*, a remediação biológica é feita no próprio local de contaminação, sem a extração do meio contaminado. Já nos processos *ex situ*, o meio extraído é tratado em instalação de depuração específica, no local ou fora (*on-site* ou *off-site*) (SEABRA, 2001).

O processo da biorremediação pode ocorrer naturalmente pela ação dos microrganismos autóctones, processo denominado atenuação natural. No entanto, em geral, os solos apresentam limitações nutricionais que submetem os microrganismos a condições entravantes, o que reduz a eficácia da biorremediação. Nesses casos o solo pode receber a introdução de nutrientes, que estimularão o metabolismo microbiano e contribuirão para o aumento das chances de sucesso do tratamento. A estimulação dos micro-organismos pela introdução de fontes nutricionais é denominada bioestimulação (SERRANO et al., 2007; STUCKI et al., 2007).

Contudo, em algumas situações a melhora nas condições nutricionais do solo não é suficiente para atingir os resultados esperados. Então, torna-se necessário realizar a introdução de microrganismos endógenos, processo conhecido como bioaugmentação (Bento et al., 2005; Serrano et al., 2007; Stucki et al., 2007).

2.3.1 Atenuação Natural

A atenuação natural é uma técnica de biorremediação, que inclui uma variedade de processos físicos, químicos e biológicos, os quais, dentro de condições favoráveis, permitem a redução de massa, toxicidade, mobilidade, volume ou concentrações de contaminantes no solo ou água subterrânea sem intervenção humana (EPA, 1999). Este processo ocorre naturalmente em qualquer área contaminada, com variável grau de eficiência, dependendo dos tipos e concentrações de contaminantes presentes e dos processos físicos, químicos e biológicos característicos do local (MOREIRA E BRAGA, 2009).

A biorremediação de compostos oleosos por populações naturais de microrganismos representa um dos mecanismos primários pelo qual os compostos poluentes são eliminados no meio ambiente (TAPAJÓS et al., 2008). A capacidade de degradar esses compostos é apresentada por diversos gêneros microbianos, principalmente bactérias, fungos e leveduras (TRINDADE, 2002). Esses microrganismos podem ser encontrados no solo, em ambientes marinhos e de água doce.

Dados obtidos em pesquisas de campo de vários pesquisadores (CHAPELLE, 1994; DAVIS e KLIER, 1994) têm comprovado que a atenuação natural limita o deslocamento dos contaminantes e, portanto, diminui a contaminação ao meio ambiente. A remediação natural não é uma alternativa de “nenhuma ação de tratamento”, mas uma forma de minimizar os riscos para o meio ambiente, através do monitoramento do deslocamento da pluma, assegurando que de que pontos receptores, poços de abastecimento de água, rios, lagos, não serão contaminados (CORSEUIL e MARINS, 1998).

Contudo, este processo natural pode ser limitado pela falta de nutrientes, elétrons receptores ou ambos. Em muitos locais, o processo de biodegradação fica limitado as zonas periféricas da área contaminada, pois a presença de contaminante em elevadas concentrações torna o ambiente extremamente hostil a proliferação de micro-organismos (RABUS; HEIDER, 1998).

2.3 2 Bioestimulação

A bioestimulação de populações de micro-organismos autóctones com o objetivo de aumentar as taxas de biodegradação é frequentemente empregada em projetos de biorremediação. O processo de bioestímulo é uma das estratégias mais adotadas em tratamentos de recuperação de áreas impactadas. Esta técnica consiste na correção das

condições ambientais, tais como nutrientes, oxigênio e umidade para aumentar a atividade da população microbiana existente nas áreas contaminadas (SARKAR *et al.*, 2005) ou ainda adição de enzimas ou surfactantes.

Os micro-organismos podem ou não, inicialmente, ter como alvo os hidrocarbonetos como fonte de alimento. Contudo, os hidrocarbonetos são, supostamente, degradados mais rapidamente do que no processo de degradação natural, devido à elevação da população de micro-organismos, causada pelo implemento dos níveis de nutrientes (SARKAR *et al.*, 2005).

A suplementação de nutrientes para a degradação de hidrocarbonetos tem sido, tradicionalmente, focada na adição de fontes de N e P, tanto orgânicas quanto inorgânicas. Devido ao fato do carbono ser o principal constituinte dos combustíveis de petróleo, a sua dosagem tem sido considerada como um índice para a determinação das quantidades de N e P que necessitam ser adicionadas para atingir a ótima relação C:N:P (SARKAR *et al.*, 2005).

No processo de bioestimulação os microrganismos se nutrem dos múltiplos compostos orgânicos para o desenvolvimento de seu metabolismo de manutenção e reprodução culminado na remoção do contaminante (ALVAREZ e ILLMAN, 2006; MARIANO *et al.*, 2008).

2.3.3 *Micro-organismos do solo*

Tanto o solo como as águas contêm elevado número de micro-organismos que, gradualmente, vão se adaptando às fontes de energia e carbono disponíveis, sendo elas açúcares facilmente metabolizáveis ou quer sejam compostos orgânicos complexos como os BTEX, formados pelos hidrocarbonetos: benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos (MARIANO, 2006a).

Na microbiota do solo se incluem grande quantidade de bactérias aeróbicas ou anaeróbicas, fungos, actinomicetos e protozoários. A maior concentração microbiológica do solo situa-se, de modo geral, na camada de 0 cm a 20 cm de profundidade (MOREIRA E SIQUEIRA, 2002).

Na camada inicial do solo ocorre maior acúmulo de matéria orgânica do solo por deposição do material vegetal da parte superficial (superior). Os solos sem cobertura vegetal tendem a ter menos matéria orgânica, pois esta não é repostada pelo material vegetal, acarretando a estes solos, uma comunidade biológica menor e menos diversificada. Desta forma, quanto mais profunda a contaminação de um solo, menor a quantidade de microbiota indígena, para realizar a descontaminação do local. Assim diferentes técnicas de

biorremediação devem ser estudadas e aplicadas para cada local específico (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002; SPINELLI, 2005; MARIANO et al., 2006b).

As condições químicas e a matéria orgânica do solo são importantes para a população microbiana co-metabolizante, que também atue na biodegradação de certos componentes do petróleo e de outros resíduos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

Os compostos de carbono da matéria orgânica servem como fonte de energia para os organismos do solo, portanto, a atividade desses está diretamente relacionada à disponibilidade de carbono, além dos outros macro e micro nutrientes. Desta forma, a atividade biológica do solo é decorrente da presença de organismos que habitam esse ambiente, das interações entre eles e as plantas e as interações bioquímicas que realizam. Eles participam de diversas reações e processos que ocorrem no solo, sendo sua existência de fundamental importância no solo (MEURER et al., 2006).

As bactérias do solo formam o grupo de micro-organismos que apresenta maior abundância e diversidade entre as espécies. A comunidade bacteriana é estimada em cerca de 10^8 e 10^9 organismos por grama de solo, variando de acordo com o método de contagem utilizado e com o tipo de manejo do solo. Esse grupo apresenta uma elevada taxa de crescimento e alta capacidade de decomposição dos diferentes substratos contidos no solo, exercendo um importante papel na decomposição de matéria orgânica e na ciclagem dos elementos (CARDOSO et al., 1992).

O conhecimento de como a biodiversidade é desenvolvida e mantida nas comunidades microbianas naturais irá auxiliar nos processos de biorremediação, de maneira que se possa manipular e controlar essa diversidade, com intuito de melhorar e estimular as taxas de degradação de compostos, como hidrocarbonetos, em ambientes contaminados (PRESCOTT, 1999). As tecnologias de biorremediação aumentam o crescimento da população microbiana e criam condições ótimas para o máximo de degradação possível (MOREIRA e SIQUEIRA 2002; BENTO et al., 2005).

2.3.4 Fatores determinantes na biorremediação

Uma biorremediação bem sucedida requer um entendimento dos fatores específicos do local que, limitem as biotransformações desejáveis ou que resultem em consequências não intencionais, como a produção de metabólitos tóxicos (ALVAREZ e ILLMAN, 2006), condições ambientais adversas tais como um pH extremo, temperatura, ou a presença de metais pesados e concentrações tóxicas podem inibir atividades microbianas específicas. Para

que ocorra um processo de biorremediação são necessários alguns requisitos principais, que foram descritos no modelo piramidal por Cookson (1994).

Em ordem de importância, primeiro é necessária a presença de micro-organismos capazes de sintetizar enzimas que podem degradar os poluentes alvos. Essas enzimas catalisam reações metabólicas que frequentemente produzem energia celular e formam blocos para as sínteses de material celular novo.

Em segundo nível, a pirâmide mostra as fontes de energia apropriadas, por exemplo, doadores de elétrons e aceptores de elétrons que devem estar presentes. Já, o terceiro nível mostra umidade e pH satisfatório; e o quarto nível, o qual mostra a importância de evitar temperaturas extremas, assegurando a disponibilidade de nutrientes tais como oxigênio, fósforo, e metais traços. E finalmente, na base da pirâmide, há três requisitos ambientais que são importantes para a sustentabilidade da biorremediação: a) ausência de altas concentrações de substâncias que são tóxicas para os micro-organismos; b) a remoção de metabólitos que podem inibir atividades microbianas específicas (talvez por outros membros da comunidade microbiana); c) ausência de altas concentrações de protozoários, que atuam como predadores das bactérias responsáveis pela degradação de contaminante.

A otimização de condições ambientais é alcançada através do entendimento dos princípios biológicos de como esses compostos são degradados, e o efeito das condições ambientais sobre os micro-organismos e nas reações metabólicas, Suthersan (2000) descreve o triângulo da biodegradação a fim de que se possa ter o entendimento da degradação microbiana de alguns compostos orgânicos e sintéticos, que consiste de conhecimento das comunidades microbianas, condições ambientais, estrutura e características físico-químicas dos compostos orgânicos a serem degradados.

Segundo Baptista et al., (2005) e Alvarez e Ilman (2006) alguns dos principais fatores ambientais para que ocorra um melhor processo de biorremediação, em solos são a disponibilidade de nutrientes; temperatura; umidade; potencial redox e pH. Segundo Rizzo e colaboradores (2008), o problema principal de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo pode estar associado à baixa biodisponibilidade destes no solo e não apenas à recalcitrância intrínseca do poluente residual, além dos fatores ótimos para a degradação.

2.3.4.1 Nutrientes

Os nutrientes necessários aos micro-organismos são subdivididos em macro e micronutrientes, conforme são necessários às células em grande e pequena quantidade,

respectivamente. Dentre os macronutrientes, o carbono é a principal fonte de nutrientes da célula microbiana, participando com 47% da sua matéria seca (SIQUEIRA et al. 1999). Em ambientes naturais o carbono é o nutriente que normalmente limita o crescimento microbiano sendo que os nutrientes inorgânicos estão presentes em quantidades que normalmente excedem as demandas das comunidades microbianas (ALEXANDER, 1999).

O desenvolvimento microbiano necessita, além do carbono, de outros nutrientes básicos, dentre eles: nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, fósforo, enxofre e, em baixo nível, diversos metais (Fe, Mn, etc.), podendo variar de acordo com o poluente (MARIANO, 2006b).

O nitrogênio é a chave da produção de proteínas e ácidos nucleicos (FRANKENBERGER, 1992; SPINELLI, 2005). Cerca de 12 a 15% da massa celular é absorvido principalmente como amônia e nitratos pelos micro-organismos decompositores, e como nitrogênio molecular atmosférico (N_2) pelos fixadores desse elemento (SIQUEIRA et al., 1999; CARDOSO, 1992).

O fósforo é necessário para produção de ATP para funções metabólicas, além de constituir ácidos nucleicos, fosfolípidios e ácidos tecóicos (FRANKENBERGER, 1992; SPINELLI, 2005). Ocorre na natureza na forma de fosfatos inorgânicos e orgânicos, sendo os primeiros (PO_4^{2-}) muito utilizados no crescimento microbiano, e os últimos utilizados sob a ação das enzimas fosfatases (SIQUEIRA et al., 1999).

Outros nutrientes que podem influenciar a degradação dos hidrocarbonetos no solo são o ferro e o enxofre, uma vez que desempenham funções celulares que estão intimamente relacionadas ao metabolismo dos hidrocarbonetos, como a participação na estrutura das enzimas que realizam a degradação destes compostos nas células microbianas (JACQUES et al., 2007).

Para que um micro-organismo utilize os compostos oleosos como fonte de carbono e energia para o seu crescimento é necessário que possua as várias enzimas que transformam as complexas moléculas em intermediários comuns das suas rotas catabólicas (MORAES e TORNISIELO, 2009).

2.3.4.2 Potencial redox

O potencial redox pode ser definido através de uma medida quantitativa de oxidação ou redução que um meio se encontra e o potencial redox pode ser determinado pelo símbolo *Eh*. Quando o *Eh* encontra-se acima de zero é comumente interpretado como um meio em

oxidação, e quando *Eh* é menor do que zero, o meio está em redução. A escala de *Eh* em um meio natural é de +800 mV (alto O₂, com nenhum processo de esgotamento de O₂) para cerca de -400 mV (alto H₂) (SUTHERSAN, 2000).

O potencial redox do solo é afetado pela profundidade abaixo da superfície e a taxa de difusão de oxigênio, que é determinada pelo tamanho e número de poros preenchidos por ar, que é função da textura, estrutura, pH, teor de água no solo, presença de carbono orgânico e microrganismos (CASARINI e SPILBORGHS, 1992).

Os micro-organismos aeróbios do solo e aquífero requerem um potencial redox em torno de 800 mV para as suas reações, enquanto que os anaeróbios requerem *Eh* de -240 mV (a 25oC e pH 7) (BITTON e GERBA, 1984).

A biodegradação de hidrocarbonetos é essencialmente uma reação de oxi-redução onde o hidrocarboneto é oxidado (doador de elétrons) e um acceptor de elétrons é reduzido (MARIANO, 2006). Quase todos os hidrocarbonetos do petróleo são biodegradados sob condições aeróbias. O Oxigênio é um co-substrato para a enzima que pode inicializar o metabolismo do hidrocarboneto e por fim é utilizado como acceptor final de elétrons para a geração de energia (YOUNG, 1984).

O oxigênio é o principal acceptor de elétrons na degradação da matéria orgânica e contaminantes (MESQUITA, 2004). Na sua ausência, o potencial redox se torna um fator limitante na degradação de contaminantes oleosos. Isto decorre uma vez que a transformação aeróbica dos hidrocarbonetos no solo leva frequentemente a um rápido esgotamento do oxigênio dissolvido, e esse eventualmente descreve o potencial redox. (KARTHIKEYAN e BHANDARI, 2001)

Há vários compostos que podem agir como aceptores de elétrons, tais como o oxigênio (O₂), nitrato (NO₃⁻), óxidos de ferro (Fe(OH)₃), sulfato (SO₄²⁻), água (H₂O) e dióxido de carbono (CO₂). A seguinte sequência de preferência de utilização desses aceptores foi observada: oxigênio>nitrato>óxidos de ferro>sulfato>água. Esta sequência reflete a diminuição do potencial de oxidação dos aceptores. Em geral, a cinética de oxidação dos hidrocarbonetos é mais rápida para aceptores de elétrons com potenciais de oxidação mais altos (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996).

2.3.4.3 pH

O pH tem relação direta com a solubilidade dos nutrientes e a atividade dos micro-organismos. Enzimas são polímeros de aminoácidos e suas atividades requerem um grau de

protonação adequado dos aminoácidos, sendo que este processo é controlado pelo pH. Bactérias heterotróficas dependem de um pH neutro ou próximo disso para biodegradar xenobióticos de modo eficiente. Os fungos, por sua vez, dependem de um meio mais ácido (CARDOSO, 1992).

O pH ótimo para a ação dos micro-organismos é usualmente próximo da neutralidade, mas muitos micro-organismos presentes nos solos podem agir sem prejuízos de suas funções para valores de pH entre 5 e 9 (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996). O pH ideal para ação dos micro-organismos presentes no solo deve estar entre 5,5 e 8,5 (CARDOSO, 1992). Wei e colaboradores (2005) estudaram a degradação de lamas oleosas de petróleo, monitorando alguns fatores importantes para a degradação. Os valores ideais para degradação deste contaminante foram de 7 a 8.

2.3.4.4 Temperatura

A temperatura do solo é função da relação entre a quantidade de energia calorífica absorvida e perdida, sendo que o primeiro fato depende da cobertura vegetal, tipo de solo, umidade entre outros. A temperatura do solo sofre variações diárias e sazonais, com marcada influência nos horizontes superficiais, portanto, na região de maior atividade microbiana (CARDOSO et al., 1992). É um dos fatores ambientais mais importantes que influenciam a atividade e a sobrevivência dos micro-organismos (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996). Baixas temperaturas diminuem a fluidez e a permeabilidade da membrana celular, que controla o transporte de nutrientes (e contaminantes) entre o meio exterior e o interior da célula microbiana. Altas temperaturas são associadas com atividades enzimáticas mais altas e taxas de biodegradação mais rápidas, até um valor que é específico de cada espécie. Nesta faixa, por exemplo, a taxa de biodegradação dos BTEX pode triplicar em função de um aumento de temperatura em 10 °C (CORSEUIL e WEBER, 1994).

As reações químicas e biológicas em solos frios são lentas (BRADY e WEIL, 1998), as decomposições biológicas são praticamente inexistentes, limitando assim o ritmo com que certos nutrientes, como nitrogênio, fósforo, enxofre e cálcio, tornam-se assimiláveis (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

Se a temperatura aumenta muito acima do valor ótimo, proteínas, enzimas e ácidos nucléicos tornam-se desnaturados e inativos. A temperatura dos primeiros 10 m de sub-superfície pode variar sazonalmente; contudo, entre 10 e 100 m de profundidade, a temperatura se aproxima da média anual da região (LEE et al., 1988).

A influência da temperatura junto com adição de nutrientes na degradação de hidrocarbonetos de petróleo, para um solo da antártica, foi estudada por Coulen e colaboradores (2005), e verificaram que o aumento da temperatura do solo de 4° C para 20° C favoreceu muito a degradação destes contaminantes.

2.3.4.5 Umidade

O teor de umidade do solo afeta diretamente a biodisponibilidade de contaminantes, a transferência de gases, o nível de toxicidade dos contaminantes, a movimentação e o estado de crescimento dos micro-organismos e a distribuição das espécies (COOKSON, 1994).

A água, ou umidade do solo, é o veículo de transporte de nutrientes e do oxigênio para fora e dentro das células dos micro-organismos (SPINELLI, 2005). Segundo Baker e Herson (1994) a água no solo pode estar presente em três formas: a) água gravitacional ou livre: a água que pode mover-se livremente através do solo por forças gravitacionais, ocupando primeiramente os macroporos da matriz do solo; b) capilar: presente nos microporos do solo e é aquela disponível para os micro-organismos; c) higroscópica: que interage com a matriz do solo e não está geralmente disponível para os micro-organismos.

A escassez assim como o excesso de água no solo é um fator limitante uma vez que as reações metabólicas dependem desta para ocorrer e o seu excesso pode inibir a passagem de oxigênio através do solo (REGINATTO, 2012). Quando o solo está quase totalmente preenchido por água, a disponibilidade de gases para os micro-organismos é menor, ou seja, tem menos disponibilidade de oxigênio para as atividades metabólicas dos micro-organismos e conseqüentemente menor degradação (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

2.3.5 Contaminantes

Vários são os contaminantes que entram em contato com o solo e que muitas vezes chegam a atingir o lençol freático. Os combustíveis em função dos diferentes tipos e seu grande uso nas atividades diárias da população, passam a ser uma potencial fonte de contaminação. Os vazamentos no transporte terrestre de combustível além da contaminação pelos tanques de armazenamento, têm salientado a importância do seu estudo tanto pela dificuldade na identificação e monitoramento de locais contaminados, como também pelo entendimento da sua interação com o ecossistema, fortemente correlacionado com o tipo de solo, e particularmente com as diferenças nas propriedades dos combustíveis como pressão de

vapor, solubilidade em água, misturas e aditivos. As diferenças nas propriedades do solo, atribuídas ao tipo, quantidade de argila, textura, atividade biológica, capacidade de retenção de água e matéria orgânica, em conjunto com as propriedades dos combustíveis, implicam em efeitos peculiares que conduzem as substâncias contaminantes para diferentes distribuições e liberação no solo, na atmosfera e água (FINE et al., 1997).

Segundo Mariano (2006a), quando um combustível atinge o solo, seus componentes separam-se em três fases: dissolvida, líquida e gasosa. Uma pequena fração dos componentes da mistura se dissolve na água do lençol freático, uma segunda porção é retida nos espaços porosos do solo na sua forma líquida pura como saturação residual e outra parte dos contaminantes passíveis de evaporação dão origem à contaminação atmosférica (NADIM et al., 1999). Portanto, uma vez estabelecida a contaminação, esta poderá atuar em três níveis diferentes: solo, água subterrânea e atmosfera. Assim, a tarefa de avaliação da extensão, dinâmica, concentração das contaminações, análise de riscos e possíveis estratégias de remediação torna-se complexa.

Os vazamentos de combustíveis se manifestam em cinco fases de contaminação no solo, que podem ser descritas da seguinte forma (COSTA et al, 1999):

a) Fase adsorvida – caracteriza-se por uma fina película de hidrocarbonetos envolvendo grumos de solo ou descontinuidades existentes na rocha, sendo mais importante para os produtos mais viscosos como o diesel;

b) Fase livre – Se constitui de um véu não miscível sobre o topo do freático livre e que pode ser mais espesso em casos onde o sistema freático é pouco dinâmico (várzeas);

c) Fase dissolvida – constitui em contaminação por dissolução de aditivos polares e por uma fração emulsionada de hidrocarbonetos que possui maior mobilidade e dissipa-se abaixo do nível freático livre, sendo mais importante para fluidos menos viscosos como a gasolina;

d) Fase vaporizada – constituem uma fase gasosa dos componentes voláteis dos combustíveis e que ocupa vazios do solo ou rocha, sendo mais importante para os hidrocarbonetos de menor ponto de vaporização, como aqueles que compõem a gasolina;

e) Fase condensada – aparece mais tipicamente em áreas urbanas onde a pavimentação do solo é intensa e pouco permeável, caracterizando-se pela acumulação de produtos condensados sob os pavimentos.

Segundo Lee e colaboradores (1988) um dos grupos de componentes mais importantes na composição dos combustíveis são os hidrocarbonetos. A alta concentração de aromáticos principalmente no óleo diesel é decorrente do seu processo de produção. Este é destilado (no

caso o diesel) em uma faixa de temperatura similar àquela em que são destilados os hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) e os derivados alquílicos (de 160° C a 410 ° C). A gasolina, por exemplo, é deionizada na faixa de 80° C a 120 °C, apresentando uma menor fração de HPAs quando comparado ao diesel.

2.3.5.1 Diesel

O óleo diesel é um produto da destilação fracionada do petróleo, e apresenta em sua composição principalmente hidrocarbonetos alifáticos de cadeia simples, não ramificados, variando de C₉-C₂₈ (ANP, 2009). Segundo a PETROBRAS (2010) Trata-se um composto formado principalmente por átomos de carbono, hidrogênio e em baixas concentrações por enxofre, nitrogênio e oxigênio e selecionados de acordo com as características de ignição e de escoamento adequadas ao funcionamento dos motores diesel. É um produto inflamável, medianamente tóxico, volátil, límpido, isento de material em suspensão e com odor forte e característico.

É um combustível obtido através da mistura de diversas correntes como gasóleos, nafta pesada, diesel leve e diesel pesado, provenientes das diversas etapas de processamento do petróleo bruto (REFAP, 2010).

Esse combustível contém de 2000 a 4000 hidrocarbonetos, uma mistura complexa de alcanos ramificados e cíclicos, e compostos aromáticos obtidos da fração meio destilada durante a separação do petróleo (GALLEGO et al., 2001).

Os hidrocarbonetos são uma família de moléculas, cuja constituição consiste, essencialmente, em átomos de Carbono e Hidrogênio. A sua constituição varia desde moléculas mais simples e mais facilmente biodegradáveis, como o Metano, até compostos mais complexos, como os que incluem anéis de Benzeno (MOURA e SAMARA, 2005).

2.3.5.2 Biodiesel

A utilização do biodiesel como combustível tem apresentado um potencial promissor no mundo inteiro. Em primeiro lugar, pela sua enorme contribuição ao meio ambiente, com a redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição ambiental, e em segundo lugar como fonte estratégica de energia renovável em substituição ao óleo diesel e outros derivados de petróleo. Dentre as matérias primas mais utilizadas figuram o óleo de soja, canola e mamona, alguns tipos de óleos de frituras e sebo bovino (NETO et al., 1999).

A definição para biodiesel adotada na Lei nº 11.097, de 13 de setembro de 2005, que introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira é: "Biodiesel: biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil."

A ideia inicial segundo a Lei nº 11.097/2005 era de 2% entre 2008 a 2012 e de 5% a partir de 2013, mas hoje isso foi modificado pela Resolução nº 6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), em que ficou obrigatório o uso de 5% de biodiesel junto ao diesel, desde 1 de janeiro de 2010. Atualmente, o diesel brasileiro recebe a adição obrigatória de 5%.

O biodiesel tem sido estudado por vários pesquisadores quanto a sua eficiência na adição no óleo, no entanto para avaliar a real eficiência e viabilidade deste biocombustível alternativo, será necessária a realização de testes de longa duração para que se possam avaliar as consequências mecânicas que o biodiesel em efetivamente acarreta em motores lacrados previamente aferidos (NETO et al., 1999).

2.3.6 Respirimetria

A respirometria é uma das técnicas que podem ser utilizadas para o acompanhamento das atividades realizadas pelos micro-organismos, e se baseia na análise do consumo de oxigênio ou produção de dióxido de carbono por unidade de volume e de tempo (BERNARDES e SOARES, 2005). Trata-se de uma metodologia adequada à quantificação da atividade biológica aeróbia, a qual determina a velocidade de respiração de uma biomassa ativa (PEDROTI, 2007).

O método respirométrico de Bartha, adaptado de uma norma holandesa, é um método simples e economicamente viável para determinar a atividade microbiológica pela geração de gás carbônico e, indiretamente, a biodegradação de contaminantes orgânicos no solo (PEDROTI, 2007). O método está descrito na NBR 14.283 (1999), para determinação do índice de biodegradação da matéria orgânica contida em resíduos a serem tratados em solos. Por meio desse método é possível avaliar a tratabilidade de resíduos em solos e inferir as condições de manejo de sistema de tratamento de resíduos em solo.

Uma das técnicas que tem se destacado é a medida da liberação de CO₂ por meio da captura do CO₂ por substância alcalina (normalmente Hidróxido de Potássio - KOH ou Hidróxido de Sódio - NaOH) e posterior precipitação na forma de Carbonato de Bário - BaCO₃, pela adição de solução saturada de Cloreto de Bário - BaCl₂. A soda excedente é,

então, titulada com Ácido Clorídrico - HCl, permitindo o cálculo da produção de gás carbônico (MARIANI, 2005).

Os métodos utilizados para a determinação da eficiência de biodegradação baseiam-se na medição de CO₂ gerado no processo de biodegradação e construção de uma curva da massa acumulada desse CO₂ em função do tempo, que deverão apresentar fases distintas, tais como: início da curva com baixíssima inclinação, que deverá corresponder à fase de adaptação dos micro-organismos, seguida de um elevado crescimento exponencial, uma vez que nesta fase estará ocorrendo elevada atividade microbiana e, por fim, a formação de um patamar, onde a eficiência da biodegradação é drasticamente reduzida (BORGES, 2006).

A respiração da comunidade do solo é utilizada como um indicador da atividade biológica (SOPPER, 1993).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

No capítulo 3 é apresentada de forma descritiva os materiais e métodos empregados para o desenvolvimento da pesquisa. O capítulo está dividido em 2 partes: Produção de Biossurfactantes e Uso dos biossurfactantes em Biorremediação.

3.1 PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES

3.1.1 MICRO-ORGANISMO E MANUTENÇÃO DO INÓCULO

Foram utilizadas as cepas LEB-52 e Paracas, da microalga *Spirulina platensis*, pertencentes ao banco de cepas do Laboratório de Fermentações da Universidade de Passo Fundo. A manutenção dos inóculos foi realizada utilizando-se o meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) ANEXO 1, diluído a 50% com água destilada, em condições de esterilidade. Os inóculos foram mantidos em erlenmeyers de 2 L, volume útil de 1,8 L, a 30°C, em estufa termostaticada, não estéril, com fotoperíodo de 12/12 h, 1800 lux de iluminância e aeração provida através de bombas de diafragma.

3.1.2 CULTIVO DA MICROALGA *Spirulina platensis*

Os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 2 L com volume inicial de meio de 1,8 L, utilizando-se o meio Zarrouk (ZARROUK, 1966), água destilada na proporção 1:1 e volume de inóculo necessário para obter-se a concentração inicial de 0,20 g_{células}/L, os quais foram mantidos em estufa termostaticada a 30°C, fotoperíodo de 12/12 h, 1800 lux de luminosidade e aeração constante.

Os cultivos foram mantidos por 29 d (Cepa PARACAS) e 33 d (Cepa LEB-52), com adição de indutores em modo batelada alimentada, conforme Planejamento Fatorial Completo 2³ com 3 pontos centrais (Tabela 3), a cada 4 d, a partir do momento em que os cultivos atingiram a concentração celular de 0,60 g_{células}/L.

Tabela 3. Planejamento Fatorial completo 2^3 com três pontos centrais para avaliação do efeito da adição de glicose, glicerol e ferro sobre o crescimento e a produção de lipídios intracelulares com atividade emulsificante na microalga *Spirulina platensis*, cepas LEB-52 e PARACAS.

<i>Exp.</i>	X_1	X_2	X_3
1	-1 (0,00)	-1 (0,00)	-1 (0,00)
2	1 (2,00)	-1 (0,00)	-1 (0,00)
3	-1 (0,00)	1 (0,10)	-1 (0,00)
4	1 (2,00)	1 (0,10)	-1 (0,00)
5	-1 (0,00)	-1 (0,00)	1 (0,02)
6	1 (2,00)	-1 (0,00)	1 (0,02)
7	-1 (0,00)	1 (0,10)	1 (0,02)
8	1 (2,00)	1 (0,10)	1 (0,02)
9	0 (1,00)	0 (0,05)	0 (0,01)
10	0 (1,00)	0 (0,05)	0 (0,01)
11	0 (1,00)	0 (0,05)	0 (0,01)

X_1 - Adição de Glicose (**2 mmol/L**); X_2 - Adição de Ferro (**0,10 mmol/L**); X_3 - Adição de Glicerol (**0,02 mmol/L**). As concentrações de adição dos indutores foram definidas a partir de pesquisas anteriores do grupo de pesquisa.

Para a microalga cepa Paracas, um segundo Planejamento Fatorial foi utilizado (Tabela 4) no qual foi fixada a concentração de glicose (3 mmol/L) e variadas as concentrações de ferro e glicerol, a fim de avaliar a influência dessas variáveis no acúmulo de lipídios.

Tabela 4. Planejamento Fatorial completo 2^2 com quatro pontos centrais para avaliação do efeito ferro e glicerol sobre o crescimento e a produção de lipídios intracelulares com atividade emulsificante na microalga *Spirulina platensis* cepa PARACAS.

<i>Exp.</i>	X_1	X_2
1	-1 (0,10)	-1 (0,02)
2	1 (0,20)	-1 (0,02)
3	-1 (0,10)	1 (0,04)
4	1 (0,20)	1 (0,04)
5	0 (0,15)	0 (0,03)
6	0 (0,15)	0 (0,03)
7	0 (0,15)	0 (0,03)
8	0 (0,15)	0 (0,03)

X_1 - Adição de ferro (mmol/L); X_2 - Adição de glicerol (mmol/L); Adição de glicose (nível fixo) 3mmol/L

Durante os cultivos foram acompanhados o crescimento celular através de leitura de absorbância a cada 4 d em espectrofotômetro (T60 – UV Visible Spectrophotometer) a 670 nm e os resultados de concentração de biomassa foram obtidos através de uma curva padrão de biomassa previamente confeccionada para cada cepa (Equações 1 e 2). O pH das amostras foi verificado a cada 4d, utilizando-se um pHmetro marca DIGIMED, modelo DM-22. Os resultados podem ser observados no APÊNDICE B.

Cepa LEB-52

$$ABS = 1,1753.[] - 0,1401 \quad (1)$$

Cepa Paracas

$$ABS = 0,8858.[] - 0,0766 \quad (2)$$

A adição dos indutores (glicose, ferro e glicerol) foi realizada através do preparo de soluções estoque nas concentrações de 2 mol/L de glicose; 20 mmol/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 20 mmol/L de glicerol.

A partir dos resultados de concentração de biomassa versus tempo foram obtidas as concentrações máximas de biomassa (C_{\max}) e a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) para cada experimento. As concentrações máximas de biomassa foram obtidas através das curvas de crescimento de biomassa em função do tempo.

A velocidade específica máxima de crescimento, calculada a partir da integração da Equação 3, foi obtida a partir de regressão exponencial na fase logarítmica de crescimento, com auxílio do Software Microsoft Office Excel 2011.

$$\mu_{\max} = \frac{1}{\Delta t_{\log}} \ln \frac{X_2}{X_1} \quad (3)$$

Em que:

μ = velocidade específica de crescimento (d^{-1})

Δt_{\log} = tempo de duração da fase log

X_1 = [] de células no início da fase log

X_2 = [] de células ao final da fase log

A partir das velocidades específicas máximas de crescimento foram calculadas os tempos de geração (tg) através da Equação 4, o qual é definido como tempo necessário para a duplicação da biomassa.

$$tg = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad (4)$$

Em que:

tg = tempo de geração (d)

μ_{\max} = velocidade específica máxima de crescimento (d^{-1})

3.1.2.1 Filtração e liofilização da biomassa

Depois de finalizados os cultivos os ensaios foram filtrados com a utilização de filtros de poliéster 180 fios em kitazato com utilização de bomba de vácuo. A biomassa obtida em cada ensaio foi liofilizada em liofilizador marca Edwards Modulyo, e após, armazenada em ultrafreezer marca Coldlab, modelo CL120-80V, sob temperatura de $-75^{\circ}C$.

3.1.2.2 Extração e determinação de lipídios

As extrações e determinações de lipídios foram realizadas pelo método de Folch e Lees (1957), adaptado segundo Colla et al. (2004). Utilizaram-se um banho ultrassônico marca Ultrasonic Cleoner Thornton T1440 e Rotaevaporador marca Fisotom, modelo 802.

A Equação 5 foi utilizada para cálculo do percentual de lipídios obtidos a partir do método de Folch e Lees (1957).

$$\% \text{ lipídio} = \frac{P_2 - P_1}{P_0} \times 100 \quad (5)$$

Em que:

P_2 = peso balão (g)

P_1 = peso balão + lipídio (gramas)

P_0 = biomassa de *Spirulina* (gramas)

Os resultados de lipídios obtidos, podem ser observados no APÊNDICE C.

3.1.2.3 Determinação da atividade emulsificante dos lipídios extraídos

A determinação da atividade emulsificante dos lipídios extraídos foi realizada através do método descrito por Martins e colaboradores (2006) adaptado, e os resultados obtidos podem ser observados no APÊNDICE D.

Após a determinação do percentual de lipídios, os lipídios foram removidos do balão com 10 mL de hexano e avolumados em balão volumétrico de 10 mL.

Para a determinação da atividade emulsificante (AE) foram utilizados tubos de ensaio com tampa de rosca (10 cm x 0,3 cm), nos quais foram adicionados 3,0 mL de água destilada, 2 mL de óleo de milho e 1,0 mL do extrato lipídico em hexano. Para os brancos, foram utilizados 3,0 mL de água destilada, 2 mL de óleo de milho e 1,0 mL de hexano. Essas misturas foram agitadas em agitador Marconi MA-162, velocidade 7, por 90 s.

Após 60 min de repouso verificou-se a absorbância do meio emulsificado em espectrofotômetro (T60 – UV Visible Spectrophotometer) a 610 nm para determinação da atividade emulsificante O/A (UE/mg_{lipídio}), utilizando-se a Equação 6.

$$AE_{O/A} = \frac{(ABS_{amostra} - ABS_{branco})}{M_{lipidio}} \cdot D \quad (6)$$

Em que:

$AE_{O/A}$ = Atividade emulsificante

$ABS_{amostra}$ = Absorbância da amostra

ABS_{branco} = Absorbância do branco

$M_{lipidio}$ = Massa de lipídio

D = diluição

Para a determinação da AE A/O, foi realizada a leitura das emulsões, após 24 h, com a utilização de paquímetro eletrônico digital Vonder, obtendo-se as leituras para os 4 raios do tubo da altura total de líquido e a altura da camada emulsionada. O índice de emulsificação (E_{24}) foi obtido através da Equação 7, descrita por Cooper e Goldenberg (1987).

$$E_{24} = \frac{H_{emulsão}}{H_{total}} \cdot 100 \quad (7)$$

Em que:

E_{24} = índice de emulsificação (%)

$H_{emulsão}$ = altura da camada de emulsão

H_{total} = altura da camada total

A partir do E_{24} obtido, foi calculada a AE A/O (UE/mg_{lipidio}) de cada ensaio através da utilização da Equação 8.

$$AE_{A/O} = \frac{(E_{amostra} - E_{branco})}{M_{lipidio}} \cdot D \quad (8)$$

Em que:

$AE_{A/O}$ = Atividade emulsificante

$E_{amostra}$ = E_{24} da amostra

E_{branco} = E_{24} do branco

D = diluição

$M_{lipidio}$ = Massa de lipídio

3.2 BIOSSURFACTANTES MICROALGAIS NA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM DIESEL E BIODIESEL

Os biossurfactantes microalgais foram utilizados em um processo de biorremediação de solo contaminado com 4% de diesel ou 4% biodiesel (B100), em comparação com a técnica de atenuação natural, durante 60 d.

O Biodiesel utilizado (B100) trata-se de um combustível composto de alquil ésteres de ácidos graxos oriundos de óleos vegetais ou gorduras animais conforme Regulamento Técnico ANP nº 4/2004, cedido pela Empresa BSBios de Passo Fundo.

Os biossurfactantes microalgais foram extraídos a partir da biomassa seca de *Spirulina platensis*, cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade de Rio Grande – FURG. A extração foi realizada utilizando-se do método de extração de lipídios microalgais, descrito por Folch e Lees (1957), adaptado utilizaram-se um banho ultrassônico marca Ultrasonic Cleoner Thornton T1440 e Rotaevaporador marca Fisotom, modelo 802.

Os ensaios foram montados em frascos herméticos com 300 g de solo, contaminantes (diesel e biodiesel) e lipídios, conforme Delineamento de Experimentos (Tabela 5) e umidade inicial de 34% (máxima capacidade de absorção de campo).

Tabela 5. Ensaio de Biorremediação

Nº	Experimento	Conteúdo
1	Controle	Solo
2	Atenuação Diesel	Solo + Diesel (4%)
3	Atenuação Biodiesel	Solo + Biodiesel – B100 (4%)
4	Bioestimulação Diesel	Solo + Diesel (4%) + Lipídio (0,5%)
5	Bioestimulação Biodiesel	Solo + Biodiesel (4%) + Lipídio (0,5%)
11	Branco	

Os ensaios foram realizados em duplicata e o experimento 11 constitui no ensaio em Branco para o método da evolução de CO₂.

3.2.1 Caracterização do solo utilizado

O solo utilizado no ensaio foi coletado no Centro Tecnológico de Engenharia Civil, Ambiental e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo (CETEC/UPF), sendo classificado

pedologicamente como um Latossolo Vermelho distrófico húmico (STRECK, et al., 2008). Do ponto de vista geotécnico, é classificado como CH, ou argila de alta plasticidade. A caracterização geotécnica e física do solo está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6. Caracterização geotécnica e física do solo utilizado

Parâmetro	Valor
Argila (%)	68
Silte (%)	5
Areia (%)	27
Limite de liquidez (%)	53,0
Limite de plasticidade (%)	42,0
Peso real dos grãos (kN/m ³)	26,7
Umidade natural (%)	34
Peso específico natural (kN/m ³)	16,3
Índice de vazios	1,19
Grau de saturação (%)	75,7
Porosidade (%)	54
pH	5,4
Matéria orgânica (%)	<0,8
Condutividade hidráulica (cm/s)	1,39x10 ⁻³

Prietto et al (2010).

O solo apresenta pH ácido, alto teor de argila, baixo teor de matéria orgânica e baixa CTC, típica de solos com predominância do argilo-mineral caulinita (STRECK et al., 2008). Conforme descrito por Azevedo e Dalmolin (2004), solos argilosos apresentam porosidade total (40 a 60%) maior que os solos arenosos (35 a 50%) .

Os solos argilosos possuem baixa permeabilidade, porém em Latossolos, que apresentam uma boa estruturação, a quantidade de macroporos é suficiente para que haja uma permeabilidade relativamente rápida de água e ar (REGINATTO, 2012).

Os solos contaminados por petróleo, particularmente os solos argilosos, possuem algumas características que podem limitar a eficácia do processo de biodegradação por apresentarem baixa permeabilidade, podendo interferir diretamente tanto na difusão de oxigênio (fundamental ao processo aeróbio de degradação) quanto na incorporação de nutrientes (BAPTISTA e RIZZO, 2004).

A acidez do solo é determinada principalmente pela concentração de Hidrogênio + Alumínio, presentes no solo. Os solos com pH ácido disponibilizam mais metais no solo. O aumento da acidez do solo é um processo natural, mas que pode ser acelerado pelas ações humanas. No que concerne aos processos de biorremediação, as bactérias são os micro-organismos mais tolerantes a acidez (STRECK, et al.,2008). Com relação à matéria orgânica (MO) seu percentual decresce com aumento da profundidade em solos residuais (MOREIRA E SIQUEIRA, 2002). Isto, associado ao maior grau de empacotamento das partículas do solo, faz com que a tendência seja a diminuição na porosidade total do solo (AZEVEDO e DALMOLIN, 2004).

A caracterização química do solo é apresentada na Tabela 7.

Tabela 7. Caracterização química do solo

Análise	Valor
P (mg/dm ³)	4,8
K (mg/dm ³)	4
MO (%)	<0,8
Al (cmol _c /dm ³)	2,1
Ca (cmol _c /dm ³)	7,0
Mg (cmol _c /dm ³)	1,4
H+Al (cmol _c /dm ³)	8,7
CTC (cmol _c /dm ³)	8,6
	Bases
	Al
Saturação (%)	20
	K
	0,1
Enxofre (mg/dm ³)	10
Boro (mg/dm ³)	0,5
Manganês (mg/dm ³)	15,6
Zinco (mg/dm ³)	0,52
Cobre (mg/dm ³)	0,73

Fonte: Reginatto, 2012.

Os micronutrientes encontrados no solo (Tabela 7) são considerados característicos para um Latossolo. A quantidade de contaminantes inorgânicos (Zinco e Cobre) está dentro dos padrões de referência determinados pela Lista Holandesa de Valores da qualidade do solo

(CETESB, 2006) e Resolução nº 420 do CONAMA (2009). O teor de alumínio foi considerado alto; o de cálcio foi considerado bom para a profundidade; já os teores de magnésio, enxofre, boro, manganês e cobre foram considerados de médios a baixos. Os micronutrientes são necessários em pequenas concentrações, mas são fundamentais nos processos de biorremediação.

Em geral estes micronutrientes são cofatores enzimáticos necessários aos processos metabólicos. No entanto, a relação de C:N:P:K está diretamente relacionada a este processo. As quantidades de fósforo (P) e potássio (K) encontradas no solo utilizado foram consideradas baixas. De acordo com Rizzo et al. (2008), a relação C:N:P:K ideal para a biorremediação é 100:10:1:1, desta forma, para a obtenção de melhores resultados na biorremediação faz-se necessária a bioestimulação com concentrações maiores de nitrogênio, fósforo e potássio. A Capacidade de Troca Catiônica (CTC) mede a capacidade que o solo tem de trocar (adsorver e dessorver) cátions. Funciona como um reservatório de nutrientes, evitando a lixiviação dos elementos químicos.

3.2.2 *Determinação do teor de umidade*

As determinações de umidade dos ensaios foram realizadas nos tempos 0, 30 e 60 d, através da Equação 9, segundo NBR 6457 (ABNT, 1986).

$$Umidade (\%) = \frac{(cápsula+solo úmido)-(cápsula+solo seco)}{(cápsula +solo seco)-(cápsula)} .100 \quad (9)$$

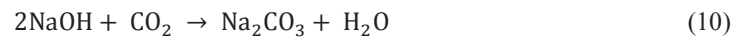
3.2.3 *Liberção/Evolução de CO₂*

Para avaliação da produção de CO₂ nos ensaios, utilizou-se a metodologia de respirometria, adaptado do método respirométrico de Bartha (1999) descrito pela NBR – 14.283 – Resíduos em solos – Determinação da Biodegradação pelo Método respirométrico.

A mensuração da geração de CO₂ foi realizada tanto nos ensaios controle, quanto nos demais ensaios. O volume da solução de HCl 0,1 N, gasto para atingir o pH capaz de mudar a coloração do indicador Fenolftaleína da cor rósea para a incolor, foi utilizado no cálculo da quantidade de CO₂ produzido, comparando-se com o volume gasto para titular o Branco (NaOH sem período de incubação no interior dos frascos). Esse cálculo é possível, pois o CO₂ resultante da biodegradação reage com o NaOH, no interior do frasco, formando Na₂CO₃.

Quando a mistura de Na_2CO_3 e excesso de NaOH é adicionada à solução de BaCl_2 1,0 N, ocorre reação do Na_2CO_3 e do BaCl_2 formando o precipitado BaCO_3 , sequestrando o Carbonato e garantindo que o HCl reaja apenas com o NaOH excedente, permitindo o cálculo da quantidade de CO_2 produzida (COSTA, 2009).

Nos frascos contendo os solos contaminados e adicionados ou não de biossurfactante microalgal foi colocado um béquer de 50 mL com 30 mL de solução de NaOH (0,5 mol/L). A cada 3 d foi retirado o béquer contendo NaOH de cada, dos quais foi retirada uma alíquota de 10 mL de NaOH para um erlenmeyer (125 mL), ao qual foi adicionado 10 mL de BaCl_2 (0,2 mol/L) e 2 gotas de indicador fenolftaleína. Esse precipitado foi titulado com HCl padronizado (0,1 mol/L) para cálculo da evolução de CO_2 (determinações feitas em duplicata). Após, o béquer era lavado com água destilada e adicionado o NaOH (30 mL), para novas determinações.



Com o volume de HCl gasto na titulação é possível saber, por estequiometria, a quantidade de CO_2 gerada pelos micro-organismos do solo em cada um dos tempos determinados, conforme Equação 12.

$$C - \text{CO}_{2(\text{mg})} = (B - V) \cdot M \cdot f \cdot 6 \cdot (V_1 \cdot V_2) \quad (12)$$

Em que:

B = Volume de HCl gasto no branco (mL)

V = Volume de HCl gasto na amostra (mol/L)

M = Concentração real do HCl (mol/L)

6 = Massa atômica do C(12) dividido pelo número de mols de CO_2 que reagem com o NaOH

V1 = Volume de NaOH usado na captura de CO_2 (mL)

V2 = Volume de NaOH usado na titulação (mL)

F = fator de correção do HCl

3.2.4 Análise de óleos e graxas

A análise de óleos e graxas foi realizada para determinar o percentual de degradação do contaminante pelos micro-organismos presentes no solo.

A análise gravimétrica de óleos e graxas foi realizada seguindo a metodologia de extração por ultrassom da USEPA 3550B (1996). O ultrassom auxilia na remoção de substâncias voláteis e semi-voláteis do solo, podendo esta ser quantificada. O cálculo do teor residual e do percentual de degradação foi calculado através da Equação 13.

$$\text{Teor residual (\%)} = \frac{P_2 - P_1}{P_0} \cdot 100 \quad (13)$$

Em que:

P_0 = Quantidade de amostra de solo em peso seco utilizada na análise (g)

P_1 = Peso do balão de fundo chato (g)

P_2 = Peso do balão de fundo chato mais a mistura B100 extraída do solo contaminado (g)

O resultado foi obtido em base seca, já que foi utilizado o valor da amostra descontado o valor da umidade. Para o resultado na forma de degradação utilizou-se a Equação 14.

$$\text{Degradação (\%)} = \frac{\% OG_{inicial} - \% OG_{final}}{\% OG_{inicial}} \cdot 100 \quad 4)$$

Em que:

$OG_{inicial}$ = percentual inicial de Óleos e Graxas

OG_{final} = percentual final de Óleos e Graxas

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

No capítulo 4 são apresentados os resultados obtidos nesta pesquisa bem como as discussões pertinentes aos mesmos. Assim como o capítulo 3, o capítulo 4 está dividido em 2 partes: Parte 1 – Produção de Biossurfactantes e Parte 2 – Uso dos biossurfactantes em Biorremediação.

4.1 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

4.1.1 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES PELA *Spirulina platensis* CEPA PARACAS

4.1.1.1 Crescimento microalgal

A Tabela 8 apresenta os resultados de crescimento celular da *S. platensis*, cepa Paracas para os experimentos do Planejamento Fatorial Completo (PFC) 2^3 , sendo mostrados os resultados de concentração máxima (C_{max}), velocidades específicas (μ_{max}), tempo de geração (Tg), intervalo de duração da fase exponencial de crescimento (Δlog), coeficiente de regressão exponencial para o cálculo de μ_{max} de cada experimento.

Tabela 8. Parâmetros de crescimento celular dos experimentos do PFC 2^3 para o cultivo em estado submerso da *Spirulina platensis*, cepa Paracas.

Exp.	X_1	X_2	X_3	C_{max} (gcélulas/L ⁻¹)	μ_{max} (d ⁻¹)	Tg (d)	Δlog (d)	R^2
1	-1 (0,00)	-1 (0,00)	-1 (0,00)	2,79	0,0978	7,09	26	0,9713
2	1 (2,00)	-1 (0,00)	-1 (0,00)	3,37	0,1456	4,76	19	0,9825
3	-1 (0,00)	1 (0,10)	-1 (0,00)	2,99	0,1085	6,39	19	0,9737
4	1 (2,00)	1 (0,10)	-1 (0,00)	4,27	0,1108	6,26	26	0,9732
5	-1 (0,00)	-1 (0,00)	1 (0,02)	2,93	0,1110	6,24	19	0,9937
6	1 (2,00)	-1 (0,00)	1 (0,02)	2,94	0,1084	6,39	26	0,9818
7	-1 (0,00)	1 (0,10)	1 (0,02)	3,05	0,0946	7,33	26	0,9813
8	1 (2,00)	1 (0,10)	1 (0,02)	3,33	0,1032	6,72	26	0,9546
9	0 (1,00)	0 (0,05)	0 (0,01)	3,01	0,1289	5,38	19	0,9625
10	0 (1,00)	0 (0,05)	0 (0,01)	3,43	0,1077	6,44	26	0,971
11	0 (1,00)	0 (0,05)	0 (0,01)	3,34	0,1138	6,34	26	0,9773

X_1 - Adição de glicose (mmol/L); X_2 - Adição de ferro (mmol/L); X_3 - Adição de glicerol (mmol/L); C_{max} = concentração celular máxima (g/L); μ_{max} = velocidade específica máxima de crescimento (d⁻¹); Tg = tempo

de geração (d); $\Delta \log$ = intervalos de tempo utilizados na regressão exponencial (d); R^2 = coeficientes de determinação das regressões.

Em todos os experimentos adicionados de nutrientes ocorreu aumento da C_{max} . Observa-se que nos experimentos com adição de glicose (2, 4, 6, 8) houve um aumento de C_{max} , especialmente no Exp. 4, no qual houve a adição da glicose e ferro. Nesse experimento verificou-se uma C_{max} de 4,27 gcélulas/L, um aumento de 53,05% na C_{max} quando comparado ao Exp. 1 (sem adição de nutrientes, C_{max} de 2,79 gcélulas/L).

A estimulação do crescimento de *Spirulina* foi verificada em meio suplementado com glicose (CHOJNACKA; NOWORYTA, 2004; MARQUEZ et al., 1993). Além disso, a presença de um substrato orgânico pode contribuir para a redução da perda noturna de biomassa (TORZILLO et al., 1991), que acontece durante o período escuro, quando a demanda energética celular é suprida pela respiração.

Muliterno e colaboradores (2005) estudaram o cultivo mixotrófico da *S. platensis* por meio da adição de glicose como fonte de carbono orgânica em modo batelada alimentada em diferentes concentrações (0,5 gL⁻¹ e 1,0 gL⁻¹), variando também a diluição do meio Zarrouk (50% e 75%) e a iluminância (1800 lux e 3000 lux). Obtiveram a concentração celular máxima de 5,38 gL⁻¹ com uma velocidade específica máxima de crescimento de 0,0063 h⁻¹, nas condições de 0,5 gL⁻¹ de glicose, diluição do meio de 75% e iluminância de 3000 lux.

Estudos anteriores revelaram que *S. platensis* cresce utilizando alguns açúcares (especialmente glicose) em condições heterotróficas e mixotróficas (RAOOF et al. 2006; MUHLING et al. 2005; MYKHAYLENKO et al. 2004; VONSAK et al., 2000; CHEN et al. 2006). Chainapong et al. (2012); Chen et al. (2005) e Vonshak et al. (2000) verificaram que em culturas mixotróficas a biomassa das algas e as taxas de crescimento específicas foram maiores do que aqueles em cultura fotoautotrófica.

O Exp. 2 apresentou o menor tempo de geração (tg) (4,76 d), e os maiores tempos de geração foram apresentados pelos Exp. 1 (7,09 d) e Exp. 7 (7,33 d), sendo que o tempo de geração representa o tempo necessário para a duplicação da biomassa. Comparando-se esses 3 ensaios, pode-se observar que o Exp. 2 também apresentou maior C_{max} (3,37 comparado a 2,79 e 3,05 dos ensaios 1 e 7), mesmo tendo permanecido menos tempo na fase exponencial. Isso pode ser explicado pelo fato do micro-organismo ter utilizado não somente o metabolismo fotossintético, mas também o metabolismo mixotrófico para obtenção de energia. E efeito do sombreamento (MYERS e BORR, 1940; VONSHAK, 1997), que resulta geralmente em menores μ_{max} para os cultivos com maior C_{max} ficou minimizado. Isto também pode ser observado nos Exp. 1 e Exp. 4.

O efeito do sombreamento é ocasionado pela diminuição da captação de luz, portanto diminuindo a fotossíntese e as taxas de crescimento representadas pela μ_{max} .

Verificou-se que a adição dos indutores glicose (X_1) e Ferro (X_2) tiveram influência positiva nos ensaios, uma vez que nos experimentos adicionados destes, os resultados de C_{max} foram superiores aos experimentos sem a adição dos indutores.

Com relação ao glicerol (X_3), este demonstrou influência positiva sobre C_{max} nos ensaios não adicionados de ferro e glicose. Já nos ensaios realizados com adição concomitante de glicose (X_1), observou-se diminuição de C_{max} , (influência negativa), demonstrando assim a interação entre as variáveis X_1 (glicose) e X_3 (glicerol).

A análise estatística corrobora os resultados acima através da demonstração dos efeitos estimados e os coeficientes de regressão das variáveis do PFC 2^3 sobre C_{max} , onde verifica-se que as variáveis X_1 (glicose) e X_2 (Ferro) foram significativas sobre C_{max} ($p=0,01$ e $p= 0,03$, respectivamente). A interação entre as variáveis X_1 (glicose) e X_3 (glicerol) também foi significativa ($p<0,05$), observando-se que quando da adição de Glicose (X_1) juntamente com glicerol (X_3) ocorreu diminuição de C_{max} .

Tabela 9. Efeitos estimados e coeficientes de regressão a partir das variáveis do planejamento 2^3 sobre C_{max} dos experimentos do cultivo em estado submerso *Spirulina platensis*, cepa Paracas.

	<i>Coefficientes de Regressão</i>	<i>Efeitos estimados</i>	<i>p</i>
Média	3,226	3,226	0,000
Glicose (X_1)	0,269	0,538	0,013
Ferro (X_2)	0,201	0,403	0,033
Glicerol (X_3)	-0,145	-0,290	0,083
Glicose – Ferro ($X_1 - X_2$)	0,121	0,243	0,127
Glicose – Glicerol ($X_1 - X_3$)	-0,195	-0,391	0,036
Ferro – Glicerol ($X_2 - X_3$)	-0,075	-0,150	0,298

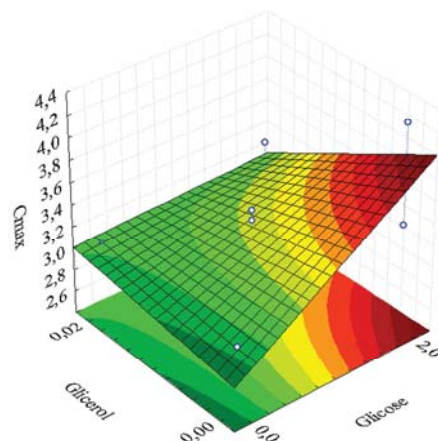
A Tabela 10 apresenta a análise de variância do modelo de regressão gerado a partir da influência das variáveis do planejamento sobre C_{max} dos experimentos do cultivo de *Spirulina platensis*, cepa Paracas, na qual verifica-se que o valor de $F_{calculado}$ é superior ao $F_{crítico}$, o que segundo Rodrigues e Iemma (2009) é necessário para que a hipótese nula seja rejeitada ao nível de significância estudado, o que implica que a variação causada pelo modelo é significativamente maior que a variação não explicada. Além do valor de F, o coeficiente de determinação (R^2) também é utilizado para checar a qualidade do modelo (Teng e Xu, 2008;

Kaushik et al. 2006). Desta forma, em função do elevado valor de F da regressão e do coeficiente de determinação, foi validado o modelo estatístico, sendo possível a apresentação da superfície de resposta (Figura 3) referente à interação das variáveis X_1 e X_3 ($p=0,03$) sobre $C_{máx}$.

Tabela 10. Análise de variância do modelo de regressão gerado a partir da influência das variáveis do planejamento sobre $C_{máx}$ dos experimentos do cultivo de *Spirulina platensis*, cepa Paracas. $R^2 = 0,92339$.

<i>Fator</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Quadrado médio</i>	<i>Fcalculado</i>	<i>Fcrítico</i>
Regressão	1,544	6	0,257	8,041	6,16
Erro	0,128	4	0,032		
Soma dos quadrados totais (SS)	1,672	10			

Figura 3. Superfície de resposta da interação entre as variáveis glicose (X_1) x glicerol (X_3).



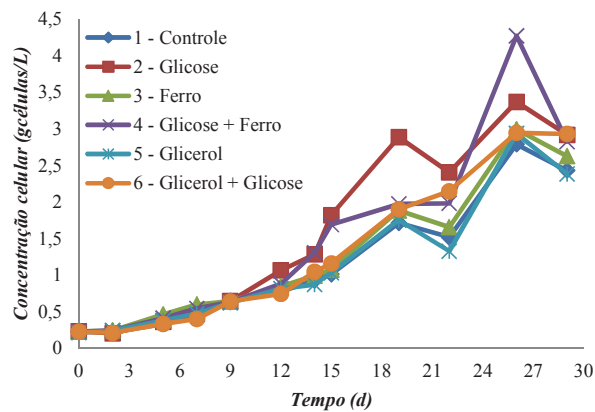
Verifica-se desta forma, que as maiores concentrações celulares ($C_{máx}$) foram obtidas no nível superior (+1) da adição da glicose, e inferior de glicerol (-1) isto é, ensaios com adição de glicose e não adição de glicerol, o que pode ser explicado pelo fato da glicose ser uma fonte de carbono orgânico de fácil assimilação no metabolismo microalgal, uma vez que é considerada um açúcar simples.

Na Figura 4 estão apresentadas as curvas de crescimento da microalga *Spirulina platensis*, cepa Paracas, durante os 29 d de cultivo dos ensaios. O crescimento dos cultivos foi

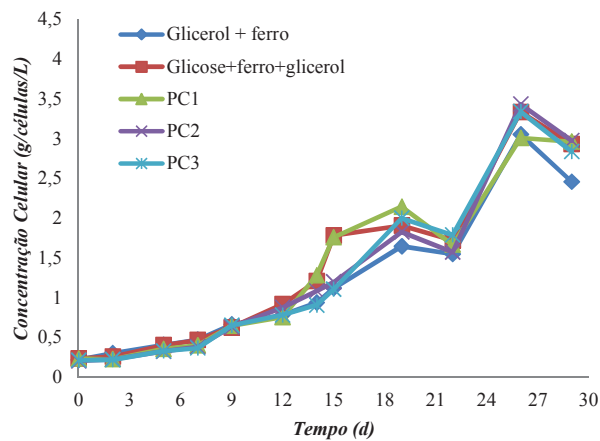
semelhante até o 12º dia, quando foram realizadas as primeiras adições das soluções com os indutores da síntese de lipídios com atividade surfactante.

Figura 4. Curvas de crescimento microalgal dos ensaios da *Spirulina platensis*, cepa Paracas.

a) Exp. 1 a 6



b) Exp. 7 a 11



4.1.1.2 Quantificação lipídios e Atividade Emulsificante dos lipídios produzidos

Na Tabela 11 são apresentados os resultados do percentual de lipídios Atividades Emulsificantes (AE AO e OA) dos lipídios obtidos a partir das biomassas dos experimentos do PFC 2³.

Tabela 11. Percentuais de lipídios e determinações referentes à Atividade Emulsificante (AE A/O e O/A) dos lipídios obtidos a partir das biomassas obtidas no PFC 2³ para a *Spirulina platensis*, cepa Paracas.

Exp.	X ₁	X ₂	X ₃	lipídios (%)	AE	
					O/A (UA/mg lip)	A/O (UE/mg lip)
1	-1 (0)	-1 (0,00)	-1 (0,00)	6,81±0,71	0,22±0,00	27,84±0,63
2	1 (2)	-1 (0,00)	-1 (0,00)	6,46±0,15	0,28±0,13	21,27±1,97
3	-1 (0)	1 (0,10)	-1 (0,00)	8,63±0,02	0,45±0,07	19,24±0,09
4	1 (2)	1 (0,10)	-1 (0,00)	7,06±0,02	0,72±0,09	24,04±0,25
5	-1 (0)	-1 (0,00)	1 (0,02)	7,04±0,57	0,53±0,02	22,60±1,95
6	1 (2)	-1 (0,00)	1 (0,02)	8,43±0,02	0,43±0,14	19,84±0,33
7	-1 (0)	1 (0,10)	1 (0,02)	9,51±0,19	0,54±0,03	17,53±0,21
8	1 (2)	1 (0,10)	1 (0,02)	9,10±0,61	0,71±0,19	19,25±2,10
9	0 (1)	0 (0,05)	0 (0,01)	4,80±0,04	1,32±0,28	36,56±2,17
10	0 (1)	0 (0,05)	0 (0,01)	5,27±0,07	1,16±0,25	33,45±1,43
11	0 (1)	0 (0,05)	0 (0,01)	3,32±0,68	1,34±0,33	52,69±2,47

X₁ - Adição de glicose (mmol/L); X₂ - Adição de ferro (mmol/L); X₃ - Adição de glicerol (mmol/L) AE – Atividade Emulsificante; O/A – Oléo em água; A/O – Água em óleo.

Verifica-se que nos experimentos adicionados de indutores, obteve-se um incremento no percentual lipídico da biomassa, com exceção do Exp. 2 (adição de glicose) e dos pontos centrais (Exp. 9, 10 e 11). Os aumentos mais expressivos foram observados nos experimentos 7 (adição de ferro e glicerol) e 8 (com adição de glicose, ferro e glicerol) nos quais houve aumento de 39,5% e 33,63% respectivamente, com relação ao experimento 1 (sem adição de indutores).

A adição dos indutores ferro e glicerol nos ensaios foi positiva, de forma que pode-se observar que houve aumento no percentual lipídico nos ensaios aos quais foram adicionados. A glicose demonstrou comportamento semelhante quando da sua adição com os outros indutores, já quando realizada a adição individual deste indutor (Exp. 2), e esta não contribuiu para o incremento do percentual lipídico da biomassa. Quanto à adição de glicose e ferro, estes contribuíram para o incremento lipídico, e também para um crescimento. Quando da adição de duas fontes de carbono (glicose e glicerol), a glicose pode ter contribuído para o crescimento do micro-organismo e o glicerol para o estresse, direcionando o metabolismo para o acúmulo de lipídios intracelulares.

O aumento do conteúdo lipídico nos ensaios com adição de ferro e glicerol (Exp. 3, Exp. 5, Exp. 7 e Exp. 8) podem ser explicados em virtude do ferro ser um importante cofator em vários processos bioquímicos, como, por exemplo, na redução de nitrato, nitrito e sulfato,

na via biossintética da clorofila e dos citocromos, na fotossíntese e na cadeia de transporte de elétrons, na fixação de nitrogênio molecular e na detoxificação de espécies reativas de oxigênio (LOURENÇO, 2006).

Liu e colaboradores (2008) demonstraram que a suplementação de ferro no início do cultivo causa uma diminuição do crescimento celular, mas estimula a produção de lipídios neutros em 56,6% quando comparada a produção com um padrão, sem suplementação de ferro. Hanna e colaboradores (2012) estudaram a influência da suplementação de CO_2 e Fe^{+3} em diferentes concentrações em cultivos de *Scenedesmus obliquus*. Observando que o acúmulo e a produtividade de lipídios totais mostram uma tendência crescente, sendo que esses lipídios apresentaram um perfil de ácido graxo adequado à produção de biodiesel, ou seja, lipídios neutros. Entretanto como neste trabalho o objetivo é a produção de lipídios com atividade emulsificante, e sabendo-se que a fração lipídica mais apropriada para este fim é a fração polar, não necessariamente o aumento do conteúdo lipídico que represente aumento nas AE OA e AO como foi observado nos resultados de AE mostrados na Tabela 11 .

Com relação ao glicerol, pode-se observar comportamento semelhante com relação ao acúmulo de lipídios observado por Cerón García e colaboradores (2000), que adicionaram glicerol ao meio durante o cultivo da microalga *Phaeodactylum tricornutum* e obtiveram uma produção de biomassa seca 74% maior do que um controle sem esse composto e ainda um percentual de lipídios por biomassa seca 3 vezes maior do que o controle sem glicerol.

A influência positiva dos indutores sobre o aumento do percentual lipídico verificadas nos ensaios foi corroborada pelos efeitos estimados e os coeficientes de regressão das variáveis do PFC 2³ (Tabela 12), onde se verifica que as variáveis ferro (X_2) e glicerol (X_3) foram significativas sobre o acúmulo de lipídios ($p=0,000$ e $p=0,001$), respectivamente, bem como a interação entre as variáveis glicose (X_1) x ferro (X_2) e glicose (X_1) x glicerol (X_3).

Tabela 12. Efeitos estimados e coeficientes de regressão a partir das variáveis do planejamento sobre a concentração de lipídios dos experimentos do cultivo da *Spirulina platensis*, cepa Paracas.

	Coeficientes de Regressão	Efeitos estimados	p
Média	7,876	7,876	0,000
Curvatura	-3,414	-6,829	0,000
Glicose (X ₁)	-0,117	-0,235	0,483
Ferro (X ₂)	0,695	1,390	0,000
Glicerol (X ₃)	0,640	1,280	0,001
Glicose – Ferro (X ₁ – X ₂)	-0,376	-0,752	0,036
Glicose – Glicerol (X ₁ – X ₃)	0,363	0,727	0,042
Ferro – Glicerol (X ₂ – X ₃)	0,091	0,182	0,584

A Tabela 13 apresenta a análise de variância do modelo de regressão gerado a partir da influência das variáveis do planejamento sobre a concentração de lipídios dos experimentos do cultivo de *Spirulina platensis*, cepa Paracas, que apresenta valor de $F_{calculado}$ superior a $F_{crítico}$, sendo possível a apresentação das superfícies de resposta (Figura 5 e Figura 6) da interação entre as variáveis: X₁-X₂ (glicose e Ferro) e X₁-X₃ (glicose e glicerol) sobre o percentual de lipídios, uma vez que apresentaram-se significativas ao nível de significância estudado ($p=0,036$ e $p=0,042$).

Tabela 13. Análise de variância do modelo de regressão gerado a partir da influência das variáveis do planejamento sobre a concentração de lipídios dos experimentos do cultivo de *Spirulina platensis*, cepa Paracas. $R^2=0,92137$.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor F calculado	F crítico
Regressão	69,895	7	9,985	23,439	2,764
Erro	5,964	14	0,426		
Soma dos quadrados totais (SS)	75,860	21			

Verifica-se nas Figura 5 e Figura 6 que os melhores resultados de percentual lipídico foram obtidos no nível inferior (-1) da adição de Glicose, isto é, sem adição do indutor e nos níveis superiores (+1) da adição de Ferro e glicerol (0,10 mmol/L de FeSO₄ e 0,02 mmol/L de glicerol). A curvatura significativa indica um ponto de mínimo, observado nos pontos centrais. Não encontrou-se explicação referendada pela literatura para justificar os pontos de mínimo obtidos nos pontos centrais relativo a influência no conteúdo lipídico microalgal. O

fato de os três indutores adicionados juntos terem ocasionado o aumento do conteúdo lipídico no Exp. 8 (9,1 %) induziria o raciocínio de que nos pontos centrais o conteúdo lipídico pudesse ser maior do que o observado.

Figura 5. Superfície de resposta da interação das variáveis glicose (X_1) x ferro (X_2) sobre a concentração de lipídios.

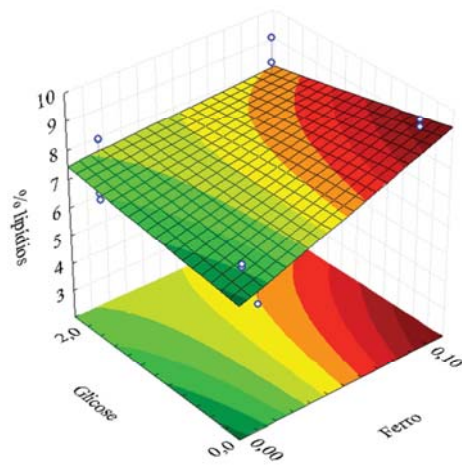
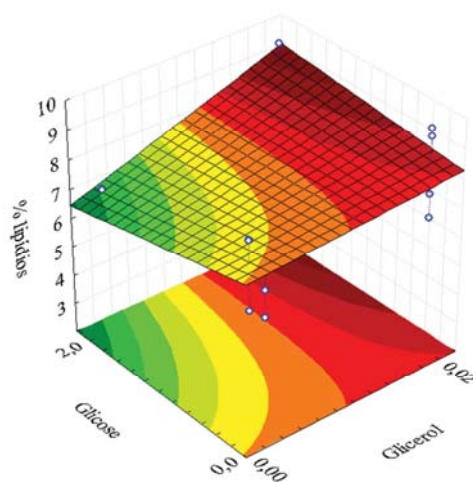


Figura 6. Superfície de resposta glicose (X_1) x glicerol (X_3) sobre a concentração de lipídios.



A Tabela 11 também apresenta as determinações da Atividade Emulsificante (AE) óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O) dos lipídios extraídos a partir dos cultivos da *Spirulina platensis*, cepa Paracas. Os resultados estão expressos em Unidade de Emulsificação por miligrama de lipídio (UE/mg_{lipídio}), obtidos a partir das Equações 4, 5 e 6, previamente apresentadas. A maior AE OA foi observada nos pontos centrais (Exp. 9, Exp. 10, Exp. 11) com 1,32 UE/mg_{lipídio}, 1,16 UE/mg_{lipídio} e 1,34 UE/mg_{lipídio}, respectivamente e a menor AE OA foi observada no Exp. 1 (Sem adição de indutores), apresentando 0,22 UE/mg_{lipídio}.

Nos experimentos adicionados de glicose, observou-se o aumento da AE OA exceto no Exp. 6 (adicionado de glicose e glicerol). Os experimentos adicionados de ferro demonstraram que a adição desse indutor também contribuiu para aumento da AE OA nos ensaios assim como os ensaios adicionados de glicerol. Verificou-se que a adição dos indutores contribuiu para o aumento da AE OA em comparação com o Exp. 1 (controle). Entretanto, apenas o Ferro (X₂) apresentou significância estatística (p=0,01) sobre AE OA.

As maiores AE AO foram obtidas nos pontos centrais (Exp. 9, Exp. 10 e Exp. 11) 36,56 UE/mg_{lipídio}; 33,45 UE/mg_{lipídio} e 52,69 UE/mg_{lipídio}, respectivamente. A menor atividade foi observada no Exp. 7 (adicionado de ferro e glicerol) no qual se obteve 17,53 UE/mg_{lipídio}, sendo este o ensaio em que se obteve o maior percentual de lipídios. Observou-se que nos ensaios a adição dos indutores acarretou aumento (nos pontos centrais) e diminuição (nos demais ensaios) da AE AO. Com relação a glicose, observa-se que quando houve sua adição, ocorreu diminuição da AE e quando não adicionada as AE observadas foram maiores, mas não superiores ao Exp. 1 (Controle). A adição de Ferro, bem como de glicerol não diferiu no comportamento, uma vez que quando adicionados resultaram em AE menores que o controle (Exp. 1). A análise estatística dos resultados da AE AO demonstrou que as variáveis do PFC 2³ não influenciaram este parâmetro.

Tabela 14. Efeitos estimados e coeficientes de regressão obtidos a partir das variáveis do planejamento sobre AE OA dos lipídios extraídos dos cultivos de *Spirulina platensis*, cepa Paracas.

	<i>Coeficientes de Regressão</i>	<i>Efeitos estimados</i>	<i>p</i>
Média.	0,484	0,484	0,000
Curv.	0,790	1,580	0,000
Glicose (X ₁)	0,051	0,102	0,256
Ferro (X ₂)	0,119	0,239	0,015
Glicerol (X ₃)	0,066	0,133	0,145
Glicose – Ferro (X ₁ – X ₂)	0,062	0,124	0,172
Glicose – Glicerol (X ₁ – X ₃)	-0,032	-0,064	0,469
Ferro – Glicerol (X ₂ – X ₃)	-0,047	-0,094	0,293

Em virtude de não serem observadas influências significativas na adição das variáveis e por alguns resultados de AE serem muito próximos, acreditou-se estar utilizando mais lipídio do que o necessário para formação da emulsão. Realizou-se diluições do extrato para a determinação da AE, a fim de verificar a influência sobre as atividades emulsificantes. Para isso, foram realizadas novas determinações, utilizando-se diluições de 10 vezes.

Observa-se as maiores AE OA e AO foram observadas na diluição 3,33 x (3,02 UE/mg_{lipídio} e 131,26 UE/mg_{lipídio}), podendo ser observada a relação entre a atividade emulsificante e a concentração de lipídios.

Na Tabela 15 estão apresentadas as Atividades Emulsificantes (AE) nas diluições de 3,33 vezes e sem diluição de extrato lipídico, a fim de que se possa fazer um comparativo entre as diluições, observando-se que se estava utilizando uma quantidade de extrato em excesso para a realização das determinações. Como o valor de atividade emulsificante é calculado em função da quantidade de lipídio presente no extrato, e considerando-se que a quantidade de óleo usada no teste é fixa, este fato apresentou influência importante sobre os resultados de atividade emulsificante dos ensaios.

Tabela 15. Determinações das Atividades Emulsificantes (AE OA e AO) das diferentes diluições dos extratos lipídicos.

Experimento	<i>AE (diluição 3,33 x)</i>		<i>AE (sem diluição)</i>	
	<i>AE OA</i>	<i>AE AO</i>	AE OA	AE AO
1	1,97±0.03	59,99±1,83	0,22±0.00	27,84±0.63
2	1,96±0.22	62,07±2.70	0,28±0.13	21,27±1.96
3	1,38±0.16	46,28±0.07	0,45±0.07	19,24±0.09
4	1,57±0.10	49,92±2.41	0,72±0.09	24,04±0.25
5	2,04±0.07	59,84±2.10	0,53±0.02	22,60±2.22
6	1,92±0.00	45,39±1.95	0,43±0.14	19,84±0.33
7	1,63±0.08	41,27±2.53	0,54±0.03	17,53±0.21
8	1,72±0.09	38,15±3.96	0,71±0.19	19,25±2.10
9	1,99±0.29	65,72±4.86	1,32±0.28	36,56±2.17
10	1,89±0.19	77,11±4.43	1,16±0.25	33,45±1.43
11	2,78±0.45	101,62±4.84	1,34±0.33	52,69±2.47

*Resultados de atividade emulsificante apresentados em UE/mg de lipídio

Observa-se que as maiores atividades foram obtidas com a diluição 3,33 vezes do extrato. A partir dessas observações foram analisadas e discutidas as AE OA e AO desta diluição.

Considerando-se os resultados de AE realizados com o extrato diluído, as maiores AE O/A (2,78 UE/mg_{lipídio}) e A/O (101,62 UE/mg_{lipídio}) foram obtidas no Exp. 11 (um dos pontos centrais), experimento que apresentou o menor acúmulo de lipídios (3,32%).

A análise estatística, dos resultados de AE refeitas com os extratos diluídos está apresentada na Tabela 16, que apresenta os efeitos estimados e coeficientes de regressão a partir das variáveis do PFC 2³, sobre AE OA e AO, sendo este resultado semelhante ao apresentado quando realizada a análise estatística dos resultados das AE realizadas com o extrato não diluído. Isso significa que a diluição dos extratos permitiu avaliar melhor o valor das AE, mas não influenciou a análise dos efeitos das variáveis sobre esta resposta.

Tabela 16. Efeitos estimados e coeficientes de regressão a partir das variáveis do planejamento sobre AE OA e AO dos lipídios dos experimentos do cultivo de *Spirulina platensis* (cepa Paracas).

	<i>AE OA</i>		<i>AE AO</i>	
	<i>Efeitos estimados</i>	<i>p</i>	<i>Efeitos estimados</i>	<i>p</i>
Média	1,766	0,000	50,362	0,000
Curvatura	0,899	0,010	62,355	0,000
Glicose (X ₁)	0,048	0,762	-2,962	0,587
Ferro (X ₂)	-0,406	0,022	-12,917	0,030
Glicerol (X ₃)	0,108	0,503	-8,402	0,138
Glicose – Ferro (X ₁ – X ₂)	0,108	0,503	3,220	0,556
Glicose – Glicerol (X ₁ – X ₃)	-0,051	0,750	-5,825	0,294
Ferro – Glicerol (X ₂ – X ₃)	0,093	0,563	0,010	0,998

O mesmo comportamento foi observado com relação as AE AO, entretanto demonstrando a influência negativa do ferro sobre AE AO, entretanto demonstrando a influência negativa do ferro sobre AE AO.

4.1.2 CEPA PARACAS (PFC 2²)

A fim de realizar-se uma sequencia na otimização da produção de biomassa e lipídios pela *Spirulina platensis*, cepa Paracas, um Planejamento Fatorial Completo 2² foi realizado, tendo como variáveis independentes a concentração de ferro e glicerol adicionados via modo batelada alimentada, visto estes fatores terem sido significativos no Planejamento anterior. A adição de glicose foi fixada em 3 mmol/L (PFC 2², apresentado na Tabela 4).

4.1.2.1 Crescimento microalgal

A Tabela 17 apresenta os parâmetros de crescimento celular da microalga para os experimentos do Planejamento Fatorial Completo (PFC) 2².

Tabela 17. Parâmetros de crescimento celular dos experimentos do cultivo em estado submerso *Spirulina platensis*, cepa Paracas (PFC 2²).

Exp.	X ₁	X ₂	C _{max} (gcélulas/L ⁻¹)	μ _{max} (d ⁻¹)	Tg (d)	Δlog (d)	R ²
1	-1 (0,10)	-1 (0,02)	4,23	0,1408	4,92	16	0,9948
2	1 (0,20)	-1 (0,02)	4,13	0,1347	5,15	16	0,9807
3	-1 (0,10)	1 (0,04)	4,36	0,1585	4,37	16	0,9853
4	1 (0,20)	1 (0,04)	4,12	0,1271	5,45	20	0,9869
5	0 (0,15)	0 (0,03)	5,11	0,1415	4,90	20	0,9862
7	0 (0,15)	0 (0,03)	4,19	0,1552	4,47	16	0,9882
8	0 (0,15)	0 (0,03)	5,70	0,1707	4,06	16	0,9700

X₁ - Adição de ferro (mmol/L); X₂ - Adição de glicerol (mmol/L); Adição de glicose fixa (3 mmol/L); C_{max} = concentração celular máxima (g/L); μ_{max} = velocidade específica máxima de crescimento (d⁻¹); Tg = tempo de geração (d); Δlog = intervalos de tempo utilizados na regressão exponencial (d); R² = coeficientes de determinação das regressões. Optou-se por excluir o Exp. 6 (ponto central).

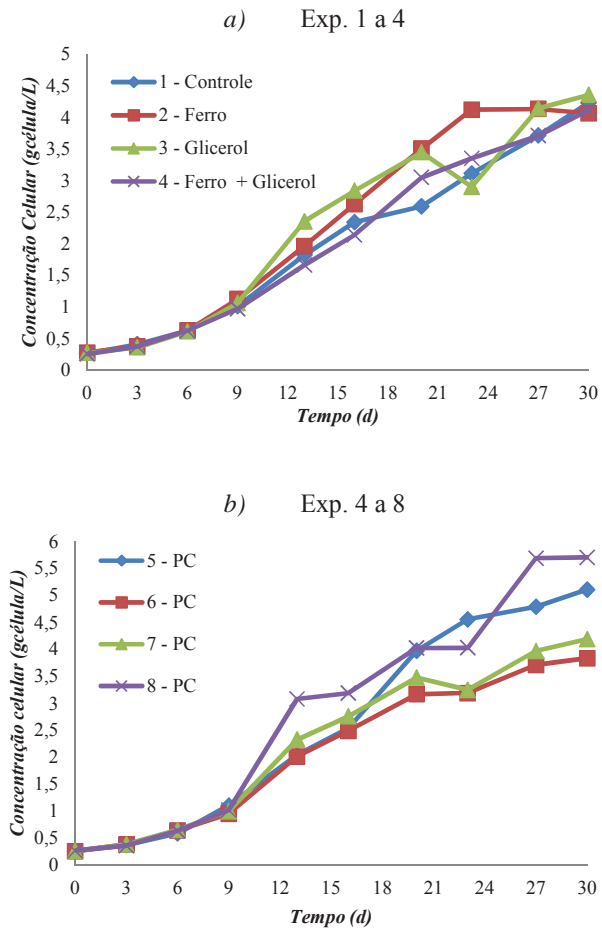
As concentrações máximas (C_{max}) observadas foram superiores às obtidas no primeiro planejamento fatorial realizado com esta cepa, possivelmente em virtude da adição de glicose ter sido fixada em uma concentração mais alta que os outros ensaios (3 mmol/L). A C_{max} foi de 5,70 gcélulas/L no Exp. 8 (ponto central, com adição de 0,15 mmol/L de Ferro e 0,03 mmol/L de Glicerol), o qual também apresentou maior μ_{max} (0,1707 d⁻¹).

O Exp. 1 (Controle) adicionado somente de glicose (3 mmol/L) apresentou C_{max} de 4,23 gcélulas/L⁻¹, μ_{max} 0,1408 d⁻¹ e tg de 4,92 d, Golmakani e colaboradores (2012) em estudo realizado com *Spirulina platensis*, sob diferentes fontes de carbono, obtiveram com cultivo com adição de glicose (1,0 g/L de glicose) em batelada alimentada resultados de C_{max} de 2,05 gcélulas/L⁻¹, μ_{max} 0,19 d⁻¹ e tg 3,71 d.

Os indutores ferro e glicerol tiveram diferentes influências sobre C_{max}. O ferro teve influência negativa (maiores C_{max} foram observadas nos ensaios da menor adição de ferro - 0,10 mmol/L) e o glicerol influência positiva, mas ambas as variáveis não demonstraram significância estatística. Este resultado difere da análise do PFC 2³ anterior, demonstrando que com o aumento da concentração de glicose esta passa a ter efeito majoritário em relação as demais variáveis.

Nas Figuras 7 a e 7 b estão apresentadas as curvas de crescimento da microalga *Spirulina platensis*, cepa Paracas durante os 30 d de cultivo dos ensaios. O crescimento dos cultivos foi semelhante até o 9º dia, no qual foram realizadas as primeiras adições das variáveis, conforme PFC 2² (Tabela 17).

Figura 7. Curvas de crescimento microalgal dos ensaios da *Spirulina platensis*, cepa Paracas, PFC 2².



4.1.2.2 Quantificação lipídios e Atividade Emulsificante dos lipídios produzidos

A Tabela 18 apresenta os percentuais de lipídios obtidos a partir das biomassas do cultivo de *Spirulina platensis*, cepa Paracas*, conforme PFC 2².

Tabela 18. Percentuais de lipídios e determinações referentes à Atividade Emulsificante (AE A/O e O/A) dos lipídios obtidos a partir das biomassas obtidas no PFC 2² para a *Spirulina platensis*, cepa Paracas.

Exp.	X_1	X_2	lipídios (%)	AE	
				O/A (UE/mg _{lip})	A/O (UE/mg _{lip})
1	-1 (0,10)	-1 (0,02)	5,73±0,18	1,23±0,02	43,68±1,78
2	1 (0,20)	-1 (0,02)	5,88±0,06	1,38±0,07	46,91±4,40
3	-1 (0,10)	1 (0,04)	4,46±0,06	1,24±0,04	42,02±2,78
4	1 (0,20)	1 (0,04)	3,99±0,02	1,75±0,07	71,64±4,32
5	0 (0,15)	0 (0,03)	4,68±0,20	1,51±0,06	30,48±1,15
6	0 (0,15)	0 (0,03)	5,88±0,09	1,71±0,12	39,13±1,52
7	0 (0,15)	0 (0,03)	5,12±0,01	1,63±0,11	41,73±1,93
8	0 (0,15)	0 (0,03)	4,92±0,09	1,35±0,00	32,65±1,90

X_1 Adição de ferro (mmol/L); X_2 - Adição de glicerol (mmol/L); AE – Atividade Emulsificante; O/A – Oléo em água; A/O – Água em óleo.

Em comparação com os percentuais de lipídios observados no PFC 2³ verifica-se um decréscimo. Embora tenha-se observado maior C_{max} com adição de glicose em 3 mmol/L, as concentrações de lipídios na biomassa diminuiram. Este efeito foi observado por Montero e colaboradores (2011) que obtiveram elevada biomassa e produção de lipídios neutros em estudos realizados com a microalga *Tetraselmis suecica*.

Os maiores percentuais de lipídios foram obtidos nos Exp. 2 (adição de 0,20 mmol/L de ferro e 0,02 mmol/L de glicerol), e Exp. 6 (ponto central) nos quais obteve-se 5,88% de lipídios. Observa-se que a adição de glicerol no seu nível superior (0,04 mmol/L) não influenciou no acúmulo de lipídios dos ensaios (Exp. 3 e Exp. 4) e sim contribuiu para uma queda de 32,14% no percentual de lipídios quando comparados ao Exp. 1, no qual se obteve 5,73% de lipídios, nos Exp. 3 e Exp. 4 obteve-se 4,46% e 3,99% de lipídios respectivamente. Pode-se afirmar que a adição do nível superior de glicerol (0,04 mmol/L) não foi positiva para o acúmulo de lipídios nos ensaios, o que pode ser confirmado pela análise estatística. A adição do ferro, quando adicionado isolado (Exp. 2) em seu nível superior (0,20 mmol/L), contribuiu de maneira discreta, para o incremento lipídico do ensaio (2,62%).

Golmakani e colaboradores (2012) realizaram cultivo de *Spirulina* com adição de glicose em batelada alimentada (1,0 g/L), e obtiveram 5,6% de lipídio nessas condições.

Semelhante ao percentual obtido no Exp. 1, o qual continha apenas adição de glicose (3 mmol/L), no qual se obteve 5,73% de lipídios.

A análise de variância demonstrou que somente a adição de glicerol foi significativa ($p < 0,001$) sobre o conteúdo lipídico apresentando efeito negativo (-0,788).

Observa-se que as maiores AE OA e AO foram obtidas no Exp. 4 (AE OA 1,75 UE/mg_{lipídio} e AE AO 71,64 UE/mg_{lipídio}) adicionado de 0,20 mmol/L de Ferro e 0,04 mmol/L de glicerol (maiores níveis da adição dos indutores). Pode-se afirmar que os indutores (ferro e glicerol) contribuíram para o aumento das AE OA e AO, uma vez que em todos os experimentos houve atividade maior do que o Exp. 1 (menores níveis de adição dos indutores).

Nos Exp. 2 e Exp. 7 obteve-se o mesmo percentual de lipídios (5,88%), mas diferentes AE OA (1,38 UE/mg_{lipídio} e 1,71 UE/mg_{lipídio}) e AE AO (46,91 UE/mg_{lipídio} e 39,13 UE/mg_{lipídio}), isso se deve ao fato de os indutores poderem estar influenciando na síntese de lipídios, direcionando a biossíntese para diferentes tipos de lipídios. Não foi objetivo deste trabalho avaliar a influência das condições de cultivo sobre o tipo de lipídios produzidos (polares ou neutros). Entretanto, sabe-se que os lipídios polares apresentam atividades emulsificantes superiores aos lipídios neutros, conforme verificado por Tochetto e Franken (2012), sendo que observaram 25,49 % \pm 0,44 correspondem aos lipídios neutros, 35,92% \pm 0,07 aos glicolipídios e 26,15 % \pm 0,23 aos fosfolipídios, sendo que os glicolipídios e os fosfolipídios constituem a fração polar.

A Tabela 19 apresenta os efeitos estimados das variáveis do planejamento sobre AE OA e AO, na qual observa-se que a influência da variável X_1 (Ferro) foi significativa ($p = 0,004$) tendo efeito positivo sobre AE OA. A variável X_2 (glicerol) não foi significativa ao nível de significância estudado.

Tabela 19. Efeitos estimados e coeficientes de regressão a partir das variáveis do PFC 2² sobre AE OA e AO dos lipídios obtidos dos cultivos da *Spirulina platensis*, cepa Paracas.

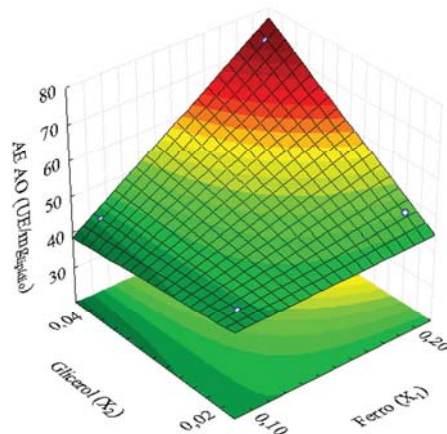
	<i>AE OA</i>		<i>AE AO</i>	
	<i>Efeitos estimados</i>	<i>p</i>	<i>Efeitos estimados</i>	<i>p</i>
Média	1,397	0,000	51,062	0,000
Curvatura	0,297	0,046	-30,135	0,000
Ferro (X_1)	0,330	0,004	16,415	0,000
Glicerol (X_2)	0,185	0,074	11,540	0,004
Ferro – Glicerol ($X_1 - X_2$)	0,180	0,081	13,190	0,001

Com relação a AE AO, verificou-se que apenas os Exp. 2 e Exp. 4 apresentaram AE AO (46,61 UE/mg_{lipídio} e 71, 64 UE/mg_{lipídio}) maiores que o Exp. 1 (43,68 UE/mg_{lipídio}). Nesses casos se observa a influência positiva da variável X_1 (Ferro) sobre AE AO, o que foi comprovado pela análise estatística. O Exp. 5 (ponto central) foi o que apresentou o menor AE AO (30,48 UE/mg_{lipídio}), em todos os pontos centrais (Exp. 6, Exp. 7 e Exp. 8) apresentaram AE AO mais baixa em relação aos demais ensaios.

Verificou-se a influência positiva e significativa das variáveis X_1 (Ferro), e X_2 (glicerol) ($p = 0,000$ e $p = 0,004$), bem como a interação entre elas (X_1 - X_2) sobre AE AO ($p = 0,001$).

A análise de variância do modelo de regressão gerado a partir da influência das variáveis do PFC 2² sobre AE AO demonstra o valor superior de F calculado, que valida a superfície de resposta (Figura 8) da interação entre as variáveis X_1 e X_2 sobre AE AO, que demonstra que obteve-se os melhores de resultados de AE AO nos níveis superiores (+1) da adição de ferro e glicerol.

Figura 8. Superfície de resposta da interação entre as variáveis Ferro (X_1) e Glicerol (X_2) sobre AE AO.



Nota: $F_{\text{calculado}} = 24,768$ e $F_{\text{critico}} = 3,356$.

Na Tabela 20 é apresentado um comparativo entres os parâmetros observados nos diferentes planejamentos experimentais (PFC 2³ e PFC 2²) da *Spirulina platensis*, cepa Paracas. O PFC 2³ teve adição dos indutores glicose (0 a 2,0 mmol/L), ferro (0 a 0,10

mmol/L) e glicerol (0 a 0,02 mmol/L) adicionados em batelada alimentada a cada 4 d. O PFC 2² teve a adição de ferro (0,10 a 0,20 mmol/L), glicerol (0,02 a 0,04 mmol/L) e a glicose foi fixada em 3 mmol/L, sendo as adições realizadas em batelada alimentada a cada 4 d.

Observando-se o crescimento celular, verificamos que o PFC 2² apresentou melhores resultados, sendo observada C_{max} de 5,70 $g_{célula}/L$ (com adição de ferro e glicerol), sendo neste PFC fixado o nível da adição de glicose em 3 mmol/L. Para o PFC 2³ obteve-se C_{max} de 4,27 $g_{célula}/L$ (com adição de glicose e ferro).

O percentual de lipídios obtido foi de 9,51 % (com adição de ferro e glicerol) no PFC 2³ e 5,88 % (adição ferro e glicerol) com nível de adição de glicose fixo no PFC 2².

As atividades emulsificantes observadas apresentaram maiores resultados no PFC 2², sendo observados AE OA 1,75 UE/ $mg_{lipídios}$ e AE AO 71,64 UE/ $mg_{lipídios}$ (no ensaio adicionado de 0,20 mmol/L de ferro e 0,02 mmol/L de glicerol). Para o PFC2³ foram observados AE OA 1,34 UE/ $mg_{lipídios}$ e AE AO 52,69 UE/ $mg_{lipídios}$ (no ensaio adicionado de todos os indutores, sendo glicose 1,0 mol/L, ferro 0,05 mmol/L e glicerol 0,01 mmol/L)

Tabela 20. Comparativo de parâmetros obtidos nos PFC 2² e PFC 2³ a partir dos cultivos de *Spirulina platensis*, cepa Paracas

<i>Spirulina platensis</i> cepa Paracas	
PFC 2 ³	PFC 2 ²
Adição dos indutores em batelada alimentada a cada 4 d	Adição dos indutores em batelada alimentada a cada 4 d
Glicose – 0 à 2,0 mmol/L	Glicose – 3 mmol/L (adição fixa)
Ferro – 0 à 0,10 mmol/L	Ferro – 0,10 à 0,20 mmol/L
Glicerol – 0 à 0,02 mmol/L	Glicerol – 0,02 à 0,04 mmol/L
μ_{\max} 0,1456 d ⁻¹	μ_{\max} 0,1707 d ⁻¹
C_{\max} 4,27 g _{células} /L	C_{\max} 5,70 g _{células} /L
Lipídios 9,51 %	Lipídios 5,88 %
AE OA 1,34 UE/mg _{lipídios}	AE OA 1,75 UE/mg _{lipídios}
AE AO 52,69 UE/mg _{lipídios}	AE AO 71,64 UE/mg _{lipídios}
Exp. 2 (glicose)	Exp. 8 (ponto central)
Exp. 4 (glicose e ferro)	Exp. 8 (ponto central)
Exp. 7 (ferro e glicerol)	Exp. 2 add ferro (+1) e glicerol (-1)
Exp. 11 (ponto central)	Exp. 6 (ponto central)
Exp. 11 (ponto central)	Exp. 4 add ferro (+1) e glicerol (+1)
	Exp. 4 add ferro (+1) e glicerol (+1)

4.1.3 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES PELA *Spirulina platensis*, CEPA LEB-52

4.1.3.1 Crescimento microalgal

A Tabela 21 apresenta os resultados de crescimento celular da *S. platensis*, cepa LEB-52 para os experimentos do Planejamento Fatorial Completo (PFC) 2^3 , sendo mostrados os resultados de concentração máxima (C_{max}), velocidades específicas (μ_{max}), tempo de geração (Tg), intervalo de duração da fase exponencial de crescimento ($\Delta\log$), coeficiente de regressão exponencial para o cálculo de μ_{max} de cada experimento.

Tabela 21. Parâmetros de crescimento celular dos experimentos do cultivo de *Spirulina platensis*, cepa LEB-52.

Exp.	X_1	X_2	X_3	C_{max} (gcélulas/L ⁻¹)	μ_{max} (d ⁻¹)	Tg (d)	$\Delta\log$ (d)	R^2
1	-1 (0,00)	-1 (0,00)	-1 (0,00)	3,02	0,0882	7,86	27	0,9224
2	1 (2,00)	-1 (0,00)	-1 (0,00)	3,69	0,1115	6,22	24	0,8916
3	-1 (0,00)	1 (0,10)	-1 (0,00)	2,73	0,0865	8,01	27	0,9257
4	1 (2,00)	1 (0,10)	-1 (0,00)	3,43	0,0969	7,15	27	0,8849
5	-1 (0,00)	-1 (0,00)	1 (0,02)	3,20	0,0945	7,33	27	0,9417
6	1 (2,00)	-1 (0,00)	1 (0,02)	3,66	0,1223	5,67	20	0,9582
7	-1 (0,00)	1 (0,10)	1 (0,02)	2,62	0,1369	5,06	17	0,9648
8	1 (2,00)	1 (0,10)	1 (0,02)	3,82	0,1013	6,84	27	0,9441
9	0 (1,00)	0 (0,05)	0 (0,01)	3,15	0,1001	6,92	27	0,9015
10	0 (1,00)	0 (0,05)	0 (0,01)	3,29	0,1145	6,05	24	0,9051

X_1 - Adição de glicose (mmol/L); X_2 - Adição de ferro (mmol/L); X_3 - Adição de glicerol (mmol/L); C_{max} = concentração celular máxima (g/L); μ_{max} = velocidade específica máxima de crescimento (d⁻¹); Tg = tempo de geração (d); $\Delta\log$ = intervalos de tempo utilizados na regressão exponencial (d); R^2 = coeficientes de determinação das regressões.

Em todos os experimentos realizados com a cepa LEB-52 e adicionados de glicose (Exp. 2, 4, 6, 8) ocorreu aumento da C_{max} a exemplo do que também foi observado nos experimentos com a cepa Paracas. Nos Exp. 3 e Exp. 7 (não adicionados de glicose) não verificou-se crescimento celular superior ao controle (Exp. 1), podendo-se afirmar que a glicose é um bom indutor para crescimento celular, isto deve-se pelo fato de a glicose estar disponível no meio, fazendo com que o micro-organismo utilize-se dela e não da glicose intracelular para seu metabolismo.

A maior C_{max} foi observada no Exp. 8 (adicionado de todos os indutores) no qual verificou-se 3,82 gcélulas/L⁻¹, a menor C_{max} foi observada no Exp. 7 (adicionado de ferro e

glicerol), $2,62 \text{ g}_{\text{células}}/\text{L}^{-1}$. Ainda comparando esses dois experimentos, o Exp. 7 apresentou maior $\mu_{\text{max}} 0,1369 \text{ d}^{-1}$ e tg de 5,06 d, enquanto o Exp. 8 apresentou $\mu_{\text{max}} 0,1013 \text{ d}^{-1}$, e tg 6,84 d. Apresentando menor C_{max} e maior μ_{max} , verifica-se que no Exp. 7 ocorreu o efeito do sombreamento celular (MYERS e BURR, 1940; VONSHAK, 1997).

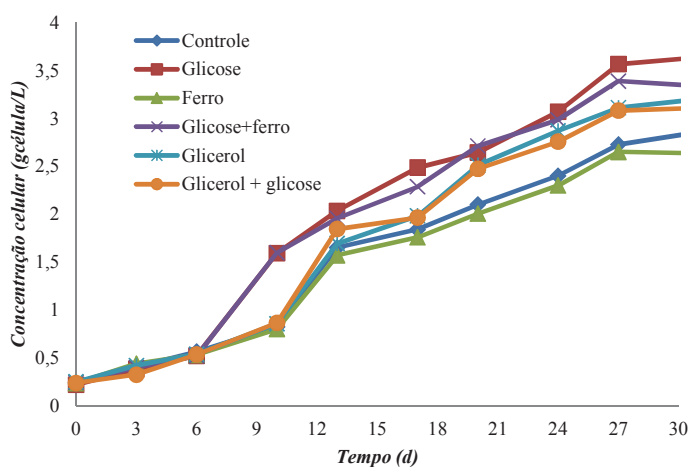
Nos Exp. 3 e Exp. 7 observa-se diminuição de C_{max} , o que pode ser observado pela adição de Ferro aos ensaios. O ferro mostrou apenas bons resultados para crescimento celular nos ensaios em que foi adicionado também de glicose. Já o glicerol também apresentou-se como influência positiva, uma vez que nos ensaios em que foi adicionado, contribuiu para o aumento de C_{max} . Nesse caso o micro-organismo realizou o metabolismo mixotrófico, utilizando fontes de carbono orgânicas (glicose e glicerol). As variáveis não apresentaram significância estatística ao nível de significância estudado sobre C_{max} .

As concentrações celulares dos ensaios realizados com as cepas Paracas e Leb-52 foram semelhantes, mas em média as maiores concentrações celulares foram observadas nos ensaios realizados com a cepa LEB-52.

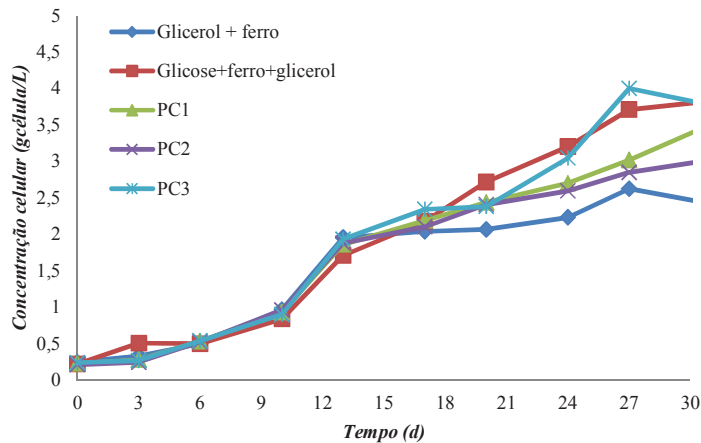
Nas Figuras 9 a e 9 b estão apresentadas as curvas de crescimento da microalga *Spirulina platensis*, cepa LEB-52 durante os 33 d de cultivo dos ensaios. O crescimento dos cultivos foi semelhante até o 6º dia, no qual foram realizadas as primeiras adições das soluções dos indutores, conforme PFC (Tabela 3).

Figura 9. Curvas de crescimento microalgal dos ensaios da *Spirulina platensis*, cepa LEB-52

a) Exp. 1 a 6



b) Exp. 7 a 11



4.1.3.2 Quantificação lipídios e Atividade Emulsificante dos lipídios produzidos

Na Tabela 22 estão apresentados os resultados do percentual de lipídios obtidos a partir dos ensaios com a *Spirulina platensis*, cepa LEB-52, bem como as determinações das atividades emulsificantes dos lipídios obtidos.

Tabela 22. Percentuais de lipídios e atividades emulsificantes (AE A/O e O/A) dos lipídios obtidos a partir das biomassas obtidas no PFC 2³ para a *Spirulina platensis*, cepa LEB-52.

Exp.	X ₁	X ₂	X ₃	(% lipídios)	AE	
					O/A (UA/mg lip)	A/O (UE/mg lip)
1	-1 (0)	-1 (0,00)	-1 (0,00)	3,71±0,23	3,77±0,41	72,32±3,36
2	1 (2)	-1 (0,00)	-1 (0,00)	4,55±0,17	2,65±0,36	51,99±5,62
3	-1 (0)	1 (0,10)	-1 (0,00)	3,48±0,16	3,59±0,35	129,02±7,14
4	1 (2)	1 (0,10)	-1 (0,00)	3,49±0,20	2,84±0,09	82,07±4,91
5	-1 (0)	-1 (0,00)	1 (0,02)	4,06±0,16	1,85±0,07	49,14±3,40
6	1 (2)	-1 (0,00)	1 (0,02)	4,28±0,25	1,67±0,21	72,79±3,79
7	-1 (0)	1 (0,10)	1 (0,02)	2,35±0,17	4,93±0,72	187,76±7,45
8	1 (2)	1 (0,10)	1 (0,02)	3,40±0,05	4,10±0,03	37,73±4,38
9	0 (1)	0 (0,05)	0 (0,01)	6,64±0,12	2,48±0,00	81,18±2,27
10	0 (1)	0 (0,05)	0 (0,01)	6,86±0,12	2,24±0,17	48,51±3,47
11	0 (1)	0 (0,05)	0 (0,01)	6,87±0,34	2,06±0,02	62,74±0,18

Com relação aos lipídios obtidos, observa-se um comportamento diferenciado no percentual de lipídios em comparação aos ensaios com a cepa Paracas, verificando-se que a

média do percentual de lipídios nos ensaios foi baixa com exceção dos resultados dos pontos centrais do PFC 2³.

O maior percentual de lipídio foi observado no Exp. 11 (ponto central) 6,87% e o menor percentual, foi observado no Exp. 7 (ferro e glicerol) 2,35%.

Observou-se que nos ensaios em que o ferro foi adicionado aos cultivos, estes apresentaram percentual menor de lipídios, quando comparados ao Exp. 1 (sem adição de nutrientes). Tanto a glicose quanto o glicerol demonstraram incremento no percentual lipídico nos ensaios aos quais foram adicionados. Já no Exp. 7, adicionado de ferro e glicerol, este apresentou percentual de lipídios inferior aos demais, sendo inclusive o ensaio no qual se obteve o menor percentual (2,35%), o que se deve a influência do indutor ferro, que não contribuiu para o incremento lipídico dos ensaios aos quais foi adicionado.

Verificou-se nos pontos centrais (Exp. 9, 10 e 11) um ponto de máximo no percentual lipídico, quando comparado aos demais ensaios. Observou-se nestes ensaios que a adição dos indutores (glicose, ferro e glicerol) contribuiu significativamente para o aumento do percentual lipídico.

Na Tabela 23 estão apresentados os efeitos estimados e coeficientes de regressão, gerados a partir das variáveis do PFC sobre o percentual de lipídios dos experimentos realizados com a *Spirulina platensis*, cepa LEB-52, verifica-se nos experimentos que todas as variáveis foram significativas para o incremento no percentual de lipídios realizados com essa cepa. A adição de glicose aos ensaios foi significativa ($p < 0,001$), de forma que nos ensaios com sua adição houve aumento do percentual de lipídios. O ferro apresentou efeito negativo significativo (-0,485 e $p < 0,001$). O mesmo comportamento foi observado para a adição de glicerol, que apresentou efeito negativo significativo (-0,141 e $p < 0,011$).

Tabela 23. Efeitos estimados e coeficientes de regressão a partir das variáveis do planejamento sobre a concentração de lipídios dos experimentos realizados com *Spirulina platensis*, cepa LEB-52. $R^2=0,97623$.

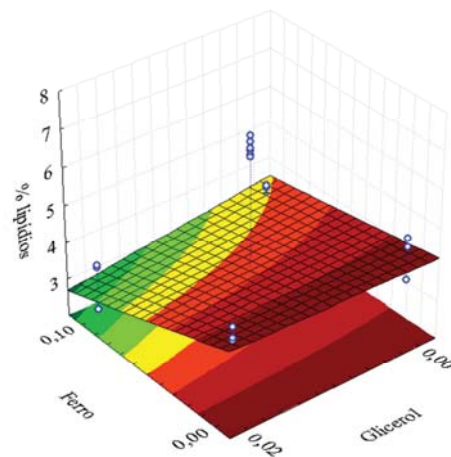
	<i>Coefficientes de Regressão</i>	<i>Efeitos estimados</i>	<i>P</i>
Média	3,663	3,663	0,000
Curvatura	3,126	6,252	0,000
Glicose (X ₁)	0,265	0,530	0,000
Ferro (X ₂)	-0,485	-0,970	0,000
Glicerol (X ₃)	-0,141	-0,282	0,011
Glicose – Ferro (X ₁ – X ₂)	-0,001	-0,002	0,979
Glicose – Glicerol (X ₁ – X ₃)	0,052	0,105	0,294
Ferro – Glicerol (X ₂ – X ₃)	-0,162	-0,325	0,004

A Tabela 24 apresenta a análise de variância do modelo de regressão gerado a partir da influência das variáveis do planejamento no percentual de lipídios do cultivo da *Spirulina platensis*, cepa LEB-52. Observa-se o valor de $F_{calculado}$ 82,127, superior ao valor de $F_{crítico}$, o que permite a apresentação da superfície de resposta da interação das variáveis X_2 (ferro) e X_3 (glicerol) sobre o percentual de lipídios (Figura 10).

Tabela 24. Análise de variância do modelo de regressão gerado a partir da influência das variáveis do planejamento sobre a concentração de lipídios do cultivo da *Spirulina platensis*, cepa LEB-52. $R^2=0,97623$.

<i>Fator</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Quadrado médio</i>	<i>Valor F calculado</i>	<i>F crítico</i>
Regressão	48,320	8	6,040	163,777	2,766
Erro	1,176	13	0,036		
Soma dos quadrados totais (SS)	49,497	21			

Figura 10. Superfície de resposta entre as variáveis ferro (X_2) x glicerol (X_3) sobre a concentração de lipídios.



Em relação às atividades emulsificantes OA e AO, obtidas a partir dos lipídios extraídos dos cultivos de *Spirulina platensis*, cepa LEB-52 (Tabela 22. Percentuais de lipídios e atividades emulsificantes (AE A/O e O/A) dos lipídios obtidos a partir das biomassas obtidas no PFC 2³ para a *Spirulina platensis*, cepa LEB-52. Tabela 22) observa-se que nos

experimentos adicionados de ferro e glicerol (Exp. 7), obtiveram-se as melhores AE, tanto O/A (4,93 UE/_{mg}lipídio) quanto A/O (187,76 UE/_{mg}lipídio), experimento este, que apresentou menor percentual de lipídios (2,35%).

Com relação à AE OA, pode-se observar que a adição de Glicose nos ensaios diminuiu a AE, quando comparados com o ensaio controle (Exp. 1), com exceção do Exp. 8, ao qual foram adicionadas todas as variáveis (glicose, ferro e glicerol). A adição de ferro, contribuiu para o aumento da AE OA nos ensaios aos quais foi adicionada. Já o glicerol, quando adicionado com glicose e ferro demonstrou maiores resultados.

O melhor resultado para AE AO foi também observado no Exp. 7 (ferro e glicerol), no qual obteve-se 187,76 UE/_{mg}lipídio e o menor resultado foi obtido no Exp. 10 (ponto central) 48,51 UE/_{mg}lipídio. A AE AO foi positivamente influenciada pela adição do indutor ferro, uma vez que contribuiu para maiores resultados de AE AO, assim como a glicose, que por sua vez teve uma influência negativa sobre as determinações em questão. Já o glicerol teve influência positiva quando adicionado de glicose e/ou ferro.

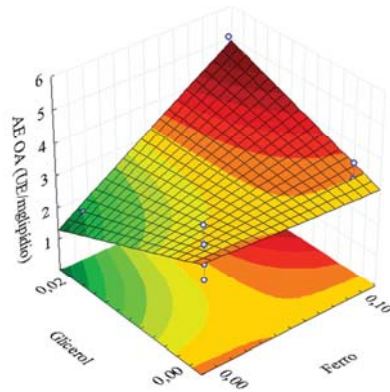
A Tabela 25 apresenta os efeitos estimados a partir das variáveis do planejamento sobre AE OA e AO dos lipídios extraídos dos cultivos da *Spirulina platensis*, cepa LEB-52, na qual confirma a influência significativa AE OA sobre as variáveis glicose (X_1) $p = 0,000$ e ferro (X_2) $p = 0,000$, sobre AE OA, na qual observa-se também o efeito negativo da glicose e positivo do ferro. Com relação às AE AO, observa-se a influência da adição de ferro aos ensaios e a não adição de glicose para melhores resultados de AE A/O.

Tabela 25. Efeitos estimados a partir das variáveis do planejamento sobre AE OA e AO dos lipídios extraídos dos cultivos da *Spirulina platensis*, cepa LEB-52.

	<i>AE OA</i>		<i>AE AO</i>	
	<i>Efeitos estimados</i>	<i>p</i>	<i>Efeitos estimados</i>	<i>p</i>
Média	3,171	0,000	82,023	0,000
Curvatura	-1,830	0,000	-35,764	0,106
Glicose (X_1)	-0,723	0,000	-56,460	0,000
Ferro (X_2)	1,381	0,000	40,150	0,002
Glicerol (X_3)	-0,076	0,645	10,437	0,351
Glicose – Ferro ($X_1 - X_2$)	-0,071	0,667	-45,377	0,000
Glicose – Glicerol ($X_1 - X_3$)	0,216	0,204	-19,470	0,093
Ferro – Glicerol ($X_2 - X_3$)	1,376	0,000	10,850	0,333

A superfície de resposta (Figura 11) referente à interação das variáveis X_2 (ferro) x X_3 (glicerol), $p=0,000$, na qual observa-se que as maiores AE AO foram obtidas nos níveis superiores (+1) de adição dessas variáveis.

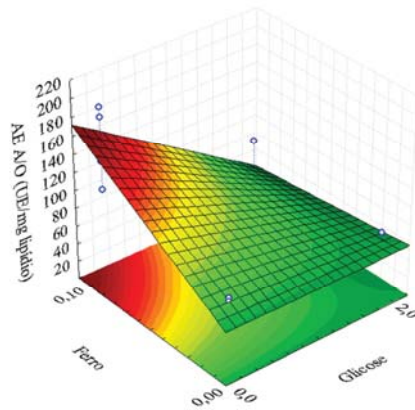
Figura 11. Superfície de resposta referente a interação das variáveis ferro (X_2) x glicerol (X_3) sobre AE OA.



NOTA: $F_{calculado}$ 28,717 e $F_{critico}$ 2,764

Superfície de resposta (Figura 12) da interação entre as variáveis glicose (X_1) x ferro (X_2) ($p=0,000$), a qual apresenta graficamente os melhores resultados de AE A/O no nível inferior (-1) da adição de glicose e no nível superior (+1) da adição de ferro.

Figura 12. Superfície de resposta da interação entre as variáveis glicose (X_1) x ferro (X_2) sobre a AE AO



NOTA: $F_{calculado}$ 9,527 e $F_{critico}$ 2,764

A Tabela 26 apresenta um comparativo dos parâmetros obtidos nos cultivos de *Spirulina platensis*, cepas Paracas e LEB-52 a partir dos PFC 2³. Nos quais os indutores glicose, ferro e glicerol foram adicionados em batelada alimentada a cada 4 d, através de soluções estoque. As adições dos indutores foram nas seguintes concentrações: glicose (0 a 2,0 mmol/L), ferro (0 a 0,10 mmol/L) e glicerol (0 a 0,02).

Os ensaios realizados com *Spirulina platensis* apresentaram comportamentos diferenciados, para as duas cepas LEB-52 e Paracas, para quase todos os parâmetros observados.

Com relação ao Crescimento Celular, a cepa Paracas apresentou melhores resultados quando da adição dos indutores glicose, ferro e glicerol, isto é, eles contribuíram para o aumento da concentração celular máxima (C_{max}) de forma positiva, sendo observadas C_{max} de 4,27 g_{célula}/L (adição de glicose e ferro nos níveis superiores), para a cepa Paracas, e 3,82 g_{células}/L (adição de todos os indutores nos níveis superiores) para a cepa LeB-52.

O percentual de lipídios obtido foi de 9,51 % (com adição de ferro e glicerol nos níveis superiores) para a cepa Paracas e 6,87 % (adição de todos os indutores no nível 0, sendo este, um dos pontos centrais) para a cepa LEB-52. A adição dos indutores foi significativa para ambas as cepas, uma vez que no ensaio adicionado de todos os indutores da cepa Paracas foi obtido um percentual de lipídios de 9,1 % (adição de todos os indutores no nível superior), próximo ao percentual obtido sem a adição da glicose.

As determinações das atividades emulsificantes apresentaram melhores resultados com a adição dos indutores (um dos pontos centrais) para a cepa Paracas, sendo observados AE OA 1,34 UE/mg_{lipídio} e AE AO 52,69 UE/mg_{lipídio}. Para a cepa LEB-52, os melhores resultados foram obtidos com adição de ferro e glicerol (nos níveis superiores), sendo obtidos AE OA 4,93 UE/mg_{lipídio} e AE AO 187,76 UE/mg_{lipídio}.

Tabela 26. Comparativo de parâmetros obtidos nos cultivos de *Spirulina platensis*, cepas Paracas e LEB-52 a partir dos PFC 2³.

<i>Spirulina platensis</i>	
Cepa Paracas	LEB-52
Adição dos indutores em batelada alimentada a cada 4 d	Adição dos indutores em batelada alimentada a cada 4 d
Glicose – 0 à 2,0 mmol/L	Glicose – 0 à 2,0 mmol/L
Ferro – 0 à 0,10 mmol/L	Ferro – 0 à 0,10 mmol/L
Glicerol – 0 à 0,02 mmol/L	Glicerol – 0 à 0,02 mmol/L
μ_{max}	μ_{max}
0,1456 d ⁻¹	0,1369 d ⁻¹
C_{max}	C_{max}
4,27 g _{células} /L	3,82 g _{células} /L
Lipídios	Lipídios
9,51 %	6,87 %
AE OA	AE OA
1,34 UE/mg _{lipídio}	4,93 UE/mg _{lipídio}
AE AO	AE AO
52,69 UE/mg _{lipídio}	187,76 UE/mg _{lipídio}
Exp. 2 (glicose)	Exp. 7 (glicerol e ferro)
Exp. 4 (glicose e ferro)	Exp. 8 (glicose, ferro e glicerol)
Exp. 7 (ferro e glicerol)	Exp. 11 (ponto central)
Exp. 11 (ponto central)	Exp. 7 (glicerol e ferro)
Exp. 11 (ponto central)	Exp. 7 (glicerol e ferro)

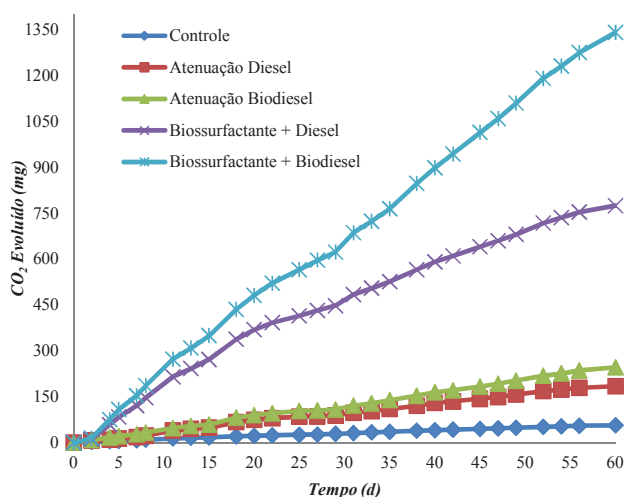
4.2 USO DOS BIOSSURFACTANTES EM BIORREMEDIAÇÃO

4.2.1 USO DOS LIPÍDIOS MICROALGAIS EXTRAÍDOS EM ENSAIO DE BIORREMEDIAÇÃO

Os lipídios microalgais extraídos foram utilizados em ensaio de biorremediação de solo contaminado com resíduos oleosos, com o objetivo de avaliar a capacidade de biodegradação dos contaminantes pelos micro-organismos em comparação com a técnica de atenuação natural.

4.2.1.2. Evolução de CO₂ e Biodegradação do contaminante

A Figura 13 apresenta a liberação de CO₂, durante os 60 d de ensaio de biorremediação. Pode-se observar que os maiores valores de C acumulado (mg C) foram verificados nos ensaios adicionados do contaminante Biodiesel + Biossurfactante lipídico (Exp. 5), os quais acumularam 1.341,65 mg de CO₂, respectivamente, seguidos dos ensaios adicionados do contaminante Diesel + Biossurfactante lipídico (Exp. 4), com 775,3 mg C gerados respectivamente. Os Exp. 1 (Controle), Exp. 2 (Atenuação Diesel) e Exp. 3 (Atenuação Biodiesel) apresentaram valores acumulados de C (mg) bem inferiores, 56,69 mg, 184,51 mg e 246,80 mg de CO₂ acumulados, respectivamente, nesses ensaios. Observa-se que os ensaios adicionados do biodiesel apresentaram maiores valores acumulados de C evoluídos quando comparados aos ensaios adicionados de diesel.

Figura 13. Evolução de CO₂ ao longo dos 60 d do ensaio.

Pedrotti (2007) avaliou durante 15 d, diferentes cepas de micro-organismos, os quais mostraram diferentes potenciais de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo, avaliadas em termos de produção de CO₂. As maiores produções de CO₂ observadas foram de 80,71 mg a 112,21 mg de CO₂.

A Tabela 27 apresenta os modelos de regressão do CO₂ evoluído em função do tempo para todos os ensaios de biorremediação.

Tabela 27. Modelo de Regressão da curva para quantificação de CO₂ evoluído.

<i>Técnica</i>	<i>Modelo</i>	<i>R²</i>
1- Controle	$CO_{2\text{evoluído(mg)}} = 0,9526t + 2,0422$	0,9665
2 - Atenuação Diesel	$CO_{2\text{evoluído(mg)}} = 3,1642t + 1,7537$	0,9951
3 - Atenuação Biodiesel	$CO_{2\text{evoluído(mg)}} = 4,1143t + 0,0374$	0,9965
4 - Diesel + Bioestimulação Lipídio	$CO_{2\text{evoluído(mg)}} = 13,085t + 53,061$	0,9804
5 - Biodiesel + Bioestimulação Lipídio	$CO_{2\text{evoluído(mg)}} = 22,559t + 0,431$	0,9983

Na Tabela 28 estão apresentados os percentuais de biodegradação de óleos e graxas obtidos nos ensaios, nos tempos inicial (0 d), 30 d e 60 d. Verifica-se que o uso do biossurfactante lipídico possibilitou elevados percentuais de biodegradação, como pode ser observado no Exp. 5 (biodiesel + biossurfactante), com biodegradação de 81,86% do

contaminante. Os ensaios realizados com diesel + biossurfactante (Exp. 4) também demonstraram alto percentual de biodegradação, nesse ensaio foi observado 81,73 % de biodegradação do contaminante. O menor percentual de biodegradação foi observado no Exp. 3 (atenuação + biodiesel), no qual obteve-se apenas 30,09 % de biodegradação.

Tabela 28. Percentual de biodegradação ao longo dos 60 d do ensaio.

<i>Ensaio</i>	<i>% de biodegradação</i>	
	<i>30 d</i>	<i>60 d</i>
2 - Atenuação Diesel	56,37±6,22	54,36±9,32
3 - Atenuação Biodiesel	33,76±2,88	30,09±7,68
4 - Diesel + Bioestimulação Lipídio	68,34±7,82	81,73±5,16
5 - Biodiesel + Bioestimulação Lipídio	68,97±1,57	81,86±0,83

Verifica-se que a biodegradação dos contaminantes diesel e biodiesel foram semelhantes quando adicionados de biossurfactante, obtendo-se percentuais de biodegradação muito próximos. Nos ensaios em que não houve adição de biossurfactante verificou-se maior percentual de biodegradação nos experimentos adicionados de diesel, o que pode ser explicado pelo fato de existirem no solo micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos de petróleo. Para a degradação do biodiesel pelos micro-organismos deste solo, o biossurfactante microalgal fez-se necessário, a fim de dispersar as moléculas do contaminante, tornando-as biodisponíveis e então serem degradadas, o que foi observado nos ensaios adicionados de biossurfactante, que independente do contaminante apresentaram percentuais de biodegradação semelhantes.

Chrzanowski e colaboradores (2012) utilizaram bactérias produtoras de ramnolipídio para biodegradação de diesel e biodiesel B20 (20% de biodiesel e 80% diesel v/v). Os resultados obtidos confirmaram que o biodiesel é o combustível de preferência biodegradado em comparação com diesel. Cyplik e colaboradores (2011) obtiveram resultados semelhantes em que as amostras de biodiesel e sem biossurfactantes foi dissipada a uma velocidade maior em relação ao óleo diesel puro, enquanto a remoção de óleo diesel na mistura B20 ocorreu a um ritmo mais lento, sendo que a degradação do diesel foi de 20%.

Estudos realizados por Santos e Milioni (2003) verificaram a biodegradação de somente 19,8% do contaminante de um solo contaminado com óleo cru e utilizando biossurfactante ramnolipídio, obtido de *Pseudomonas*. Milioni e colaboradores (2007)

utilizaram biossurfactante ramnolipídio (0,4 % e 0,6 %) para biodegradação de óleo cru e obtiveram 50% de biodegradação do contaminante.

Lin e colaboradores (2011) estudaram a biodegradação de óleo testando 5 tratamentos ao longo de 100 d: landfarming convencional, aprimoramento de nutrientes, adição de biossurfactante ramnolipídio, bioaumentação (consórcio microbiano de quatro cepas de bactérias degradadoras de petróleo), e combinação de bioaumentação e adição de biossurfactante. A melhor eficiência de degradação total foi obtida por bioaumentação + biossurfactante (90 %), seguida por bioaumentação (86 %), aprimoramento de nutrientes (84 %), adição de biossurfactante (78 %) e landfarming (68 %). A velocidade de degradação observada foi bem maior no início. Resultados semelhantes foram em nosso trabalho, com percentual de biodegradação de 80 %, com maiores percentuais de biodegradação nos primeiros 30 d.

Este comportamento é explicado por Tauk (1990), uma vez que no solo ocorre uma rápida decomposição inicial da matéria lábil e, posteriormente, num processo mais lento, a decomposição de materiais resistentes. Esta fase lenta pode ocorrer devido ao mecanismo de adsorção, a estabilização dos metabólitos e a queda da taxa de biomassa no solo. Verificou-se neste trabalho que enquanto nos ensaios de atenuação a biodegradação ocorreu somente até os 30 d, nos ensaios com biossurfactante a biodegradação ocorreu mesmo que em taxas inferiores aos primeiros 30 d até os 60 d de ensaio. Isto demonstra a ação dos biossurfactantes nos processos de mobilização dos contaminantes da fração orgânica do solo.

Kaczorek e colaboradores (2011) verificaram que a biodegradação dos hidrocarbonetos insolúveis em água pode ser significativamente aumentada pela adição de biossurfactante. Os resultados obtidos indicaram que, neste sistema de biodegradação, depois de 21 d, 92% do óleo diesel pode ser degradado usando *Pseudomonas alcaligenes*. Verificaram que o tipo de fonte de carbono influencia as propriedades de superfície das células dos micro-organismos.

Em estudo sobre a eficiência e o padrão de degradação de petróleo de amostras de lodo e solo arenoso poluído de uma refinaria de óleo, foi utilizado um consórcio bacteriano de *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Bacillus* e *Micromonospora*, isolados a partir de uma amostra de lama de petróleo e caracterizados. Nitrogênio, fósforo e um surfactante químico foram adicionados para ambas as amostras e a bioaumentação foi usada na amostra de solo. Depois de 12 semanas, o grau obtido de degradação de TPH (total de hidrocarbonetos de petróleo) elevou-se a 82 % - 88 % em lama de petróleo e 86 % - 91 % no solo poluído (GOJGIC-CVIJOVIC et. al. 2011).

4.2.1.2.1 Análise estatística dos resultados

A Tabela 29 apresenta os efeitos estimados e coeficientes de regressão gerados a partir das variáveis sobre a evolução de CO₂, verificando-se que as variáveis (técnica de biorremediação e contaminante) foram significativas ($p < 0,001$) sobre a evolução de CO₂. Os efeitos estimados foram positivos (X_1 efeito = 842,81 e X_2 efeito = 314,31). A interação entre as variáveis $X_1 - X_2$ também apresentou efeito positivo significativo (efeito = 252,02 e $p = 0,001$). Demonstrando que tanto a técnica (adição de biossurfactante) como o contaminante (biodiesel) foram as melhores condições para os maiores valores acumulados de C (1.341,65 mg).

Tabela 29. Efeitos estimados e coeficientes de regressão gerados a partir das variáveis sobre a Evolução de CO₂.

	<i>Coefficientes de Regressão</i>	<i>Efeitos estimados</i>	<i>p</i>
Média	5478639	637,06	<0,001
Técnica (X_1)	-50319	842,81	<0,001
Contaminante (X_2)	-54880	314,31	<0,001
Técnica–Contaminante ($X_1 - X_2$)	504	252,02	0,001

Na análise de variância do modelo de regressão gerado a partir da influência das variáveis sobre a Evolução de CO₂, na qual verificou-se valor de $F_{calculado}$ (26,07), superior ao $F_{crítico}$ (6,59) validando o modelo estatístico.

A Tabela 30 apresenta os efeitos estimados e os coeficientes de regressão gerados a partir das variáveis (técnica de biorremediação e tipo de contaminante) sobre o percentual de biodegradação do contaminante na qual observa-se o efeito positivo e significativo de X_1 (Técnica) (39,567 e $p=0,001$). A variável X_2 e a interação entre as variáveis X_1 (Técnica) x X_2 (Contaminante) não apresentaram-se significativas ao nível de significância estudado.

Tabela 30. Efeitos estimados e coeficientes de regressão gerados a partir das variáveis sobre o percentual de biodegradação de óleos e graxas.

	<i>Coefficientes de Regressão</i>	<i>Efeitos estimados</i>	<i>p</i>
Média	268086,9	62,013	0,000
Técnica (X ₁)	-2436,5	39,567	0,001
Contaminante (X ₂)	-2683,3	-12,072	0,060
Técnica– Contaminante (X ₁ – X ₂)	24,4	12,197	0,058

A Tabela 31 apresenta a comparação de médias através do Teste de Tukey a 5% de significância para o percentual de biodegradação e evolução de CO₂ em função da técnica e do contaminante.

Tabela 31. Teste de Tukey para comparação das médias das variáveis sobre % de biodegradação.

<i>Técnica</i>	<i>Contaminante</i>	<i>Biodegradação (%) (médias)</i>	<i>Evolução de CO₂ (médias)</i>
2 Atenuação	Biodiesel	30,09 ^a	246,80 ^a
1 Atenuação	Diesel	54,36 ^a	184,51 ^a
3 Biossurfactante	Diesel	81,73 ^b	775,30 ^b
4 Biossurfactante	Biodiesel	81,86 ^b	1341,64 ^c

NOTA: Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa a 5% de significância.

Verifica-se através dos resultados do teste de Tukey (Tabela 7) que a técnica de biorremediação utilizada foi significativa ($p < 0,05$) sobre o percentual de biodegradação e sobre a evolução de CO₂ obtidos nos ensaios, sendo que os melhores resultados foram obtidos nos solos adicionados do biossurfactante lipídico. O contaminante influenciou os resultados de CO₂ obtidos, sendo a maior evolução de CO₂ obtida no ensaio adicionado de biodiesel ($p < 0,05$) em comparação com os demais ensaios. O ensaio adicionado de diesel e biossurfactante também apresentou resultados de evolução de CO₂ superiores aos obtidos na atenuação natural ($p < 0,05$).

Esse comportamento é explicado via rotas metabólicas pela quais esses contaminantes são degradados (DEON, et al, 2012). O biodiesel é um combustível derivado de óleos vegetais ou animais, normalmente composto de ésteres metílicos e ácidos graxos de cadeia longa (SCOTT et al., 2010). No processo de biodegradação, os ácidos graxos são convertidos diretamente até acetilCOA pela beta-oxidação para posterior conversão a CO₂ através do ciclo

de Krebs (BERG et al., 2006). Em comparação, os hidrocarbonetos de cadeia linear (alcanos, alcenos) primeiramente precisam ser convertidos a alcoóis, aldeídos e posteriormente a ácidos graxos, para então serem convertidos via β -oxidação (FRITSCHKE e HOFRICHTER, 2005). Já compostos aromáticos como os HPAs e BTEX, presentes no óleo diesel, envolvem a conversão do substrato aromático em um metabólito como o catecol, com posterior abertura do anel por enzimas denominadas dioxigenases e conversão a compostos como acetil-CoA, oxalato e piruvato, os quais são intermediários do processo respiratório (LEMOS et al., 2009).

CONCLUSÃO

O crescimento celular da microalga *Spirulina platensis* foi beneficiado pela adição dos indutores glicose, ferro e glicerol, sendo obtida concentração celular máxima de 5,70 g_{ccélula}/L no cultivo realizado com a cepa Paracas, nas concentrações de glicose de 3 mmol/L, ferro de 0,15 mmol/L e glicerol de 0,03 mmol/L.

O maior percentual de lipídios foi obtido com a *Spirulina platensis* cepa Paracas, obtendo-se 9,51 % de lipídios com a adição de ferro (0,10 mmol/L) e glicerol (0,02 mmol/L).

Os melhores resultados de atividade emulsificante foram obtidos com a cepa LEB-52, com adição de ferro (0,10 mmol/L) e glicerol (0,02 mmol/L), sendo observados os valores de AE OA 4,93 UE/mg_{lipídio} e AE AO 187,76 UE/mg_{lipídio}.

A melhor cepa para acúmulo de lipídios e produtividade de biomassa é a *Spirulina platensis* cepa Paracas, cultivada com adição dos indutores glicose, glicerol e ferro.

A biorremediação de solo contaminado com diesel e biodiesel adicionada de biossurfactante microalgal demonstrou-se eficiente, apresentando resultados de biodegradação e evolução de CO₂ elevados. Obteve-se 81,7 % e 81,9 % de biodegradação para o diesel e biodiesel, respectivamente, em comparação com a atenuação natural, na qual obteve-se 54,4 % e 30,1 % para diesel e biodiesel. A evolução de CO₂ apresentou 1.341,65 mg e 775,3 mg de C (mg) acumulado para o biodiesel e diesel, respectivamente, nos ensaios adicionados do biossurfactante.

Os lipídios microalgais, extraídos da microalga *S. platensis* demonstraram-se eficientes e com grande potencial de aplicação em processos de biorremediação de resíduos oleosos.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Testar diferentes níveis e modo de adição dos indutores;
- Testar outros indutores para acúmulo de lipídios, entre eles Nitrogênio e Fósforo;
- Caracterizar e classificar os lipídios microalgais da *Spirulina platensis* como biossurfactantes e elencar potenciais novas aplicações nos mais diferentes setores;
- Definir condições de cultivo para FES de *Spirulina platensis*;

REFERÊNCIAS

ABALDE, J. et al. **Microalgas: cultivo e aplicaciones**. España: Universidade da Coruña, 1995. 210p.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. Resíduos em solos: determinação da biodegradação pelo método respirométrico. NBR 14.283. Rio de Janeiro, 1999.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. Amostras de solo - Preparação para ensaios de compactação e ensaios de caracterização. NBR 6.457. Rio de Janeiro, 1986.

ALONSO, D. L. et al. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. **Phytochemistry**, 54, 461-471, 2000.

ALVAREZ, P. J.J.; ILLMAN, W. A. **Bioremediation and naturalattenuation: process fundamentals and mathematical models**. New Jersey: Wiley- Interscience, 609 p. 2006.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, 264(1-4): 130-134, 2007.

ANDRADE, M. et al. Perda química de carbono e cinética do crescimento celular em cultivos de *Spirulina*. **Quim. Nova**, v. 31, n. 8, 2031-2034, 2008.

AMIN, G. A. A Potent Biosurfactant Producing Bacterial Strain for Application in Enhanced Oil Recovery Applications. **Journal of Petroleum Environmental Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 1-5, 2010.

ANEJA, R.K.; CHAUDHARY, G.; AHLUWALIA, S.S.; GOYAL, D. Biosorption of Pb²⁺ and Zn²⁺ by non-living biomass of *Spirulina sp.* **Indian Journal Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 438-442, 2010.

ANP – Agência Nacional do Petróleo. 2004. *Resolução ANP 42/2004*.

AŞÇI, Y.; et. al. Investigation of sorption/desorption equilibria of heavy metal ions on/from quartz using rhamnolipid biosurfactant. **J. Environ. Manage.**91, 724–731, 2010.

AZEVEDO, A. C de; DALMOLIN, R. S. D. **Solos e ambiente: uma introdução**. Santa Maria: Ed. Pallotti, 2004.

BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, 51, 1-12, 1995.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 53:495–508, 2000.

BAPTISTA, P. M. e RIZZO, A. C. de. L. **Acompanhamento do processo de Atenuação Natural de solo contaminado por petróleo**.In: XII Jornada de Iniciação Científica do CETEM/MCT, 2004.

BARBOSA, M. M. C.; PAZ, M. C. F. Produção de biossurfactantes por *Chromobacterium violaceum* utilizando como substrato óleo vegetal (óleo de pequi). **II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica**. João Pessoa, 2007.

BARROS, F. F. C.; et al. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 28(4), 979-985, out.-dez. 2008.

BELAY, A. The potential application os Spirulina (Arthrospira) as a Nutritional and Therapeutic Supplemente in Health Management. *Journal of the American nutraceutical association*, v. 5, n.2, 2002.

BELOKOBYSKY, A. I. et al. Accumulation of selenium and chromium in the growth dynamics of *Spirulina platensis*. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 259, n. 1, p. 65.68, 2004.

BENTO F. M. et al. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 1049-1055, 2005.

BERNARDES, R. S. e SOARES, S. R. A. **Fundamentos da Respirometria no controle de poluição da água e do solo**. Editora Universidade de Brasília: Finatec, Brasília, DF, 164p, 2005.

BEZERRA, M. S. **Levantamento de critérios para a amplificação de escala da produção de biossurfactante utilizando melão como substrato**. Natal: UFRN, 2006. Dissertação de mestrado em Engenharia Química.

BITTON, G.; GERBA, C. P. **Ground water. Pollution Microbiology**. John Wiley & Sons. N.Y. 377p., 1984.

BORGES, F.A.T. **Biodegradação de fluídos de base e de cascalhos oriundos da perfuração de poços de petróleo e gás**. Vitória:UFES, 2006. Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental.

CARDOSO, E. J. B. N. *Ecologia microbiona do solo*. In: CARDOSO, E. J. B. N. (coord.), TSAI, S. M.,NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciências do Solo,1992, 360p.

CERON GARCIA, M. C. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. *Journal of Applied Phycology*, n. 12, p. 239 – 248, 2000.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo. **Meio Ambiente**. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br> .

CIFERRI, O.; TIBONI, O. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. *Ann. Rev. Microbiol.* 39, 503-26, 1985.

CHA, M.; et al. Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*. *Bioresource Technology*, 99, 2192–2199, 2008.

CHAINAPONG, T.; TRAICHAITYAPORN, S.; DEMING, R. L. Effect of light quality on biomass and pigment production in photoautotrophic and mixotrophic cultures of *Spirulina platensis*. *Journal of Agricultural Technology*, Vol. 8(5): 1593-1604, 2012.

CHEN, F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Tibtech* 114:421–426, 1996.

CHISTI, Y. Microalgae: our marine forests. Book reviews: RICHMOND, A. (ed.). Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, 2004. 566 p. *Biotechnology Advances*, n. 22, p. 565-567, 2004.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294–306, 2007.

CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic culture. *Enzyme and Microbial Technology* 34: 461-465, 2004.

CHOJNACKA, K.; ZIELINSKA, A. Evaluation of growth yield of *Spirulina* (*Arthrospira*) sp. in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *World J. Microbiol Biotechnol*, 28:437–445, 2012.

CHRZANOWSKI, T.; et al. Biodegradation of rhamnolipids in liquid cultures: Effect of biosurfactant dissipation on diesel fuel/B20 blend biodegradation efficiency and bacterial community composition. *Bioresource Technology*, 111, 328–335, 2012.

COHEN, Z. The chemical of *Spirulina*. In VONSHAK, A., ed *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor and Francis, p. 175-204, 1997.

COLLA, L. M. et al. Fatty Acids Profile of *Spirulina platensis* Grown Under Different Temperatures and Nitrogen Concentrations. *Z. Naturforsch*, 59c, 55-59, 2004.

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE-CONAMA. **Resolução conama nº 420, de 28 de dezembro de 2009**. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Diário oficial da União, 30 Dez. 2009.

COOKSON, J. T. **Bioremediation Engineering: Design and Application**. McGraw-Hill. New York. 1994.

COOPER, D. G. et al. Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 408-412, 1981.

COOPER D.G. e GOLDENBERG B.G. Surface –active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 224-229, 1987.

CORSEUIL, H. X.; MARINS, M. D. M. Efeitos causados pela mistura de gasolina e álcool em contaminações de águas subterrâneas. **Boletim Técnico Petrobrás**, v.41, p.133-138, 1998.

CORSEUIL, H. X. (1994) **Influência do Receptor de Elétrons na Biorremediação de Águas Subterrâneas Contaminadas por Derramamentos de Gasolina**. VI Simpósio Luso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Vol. I, p.68-75, Florianópolis.

CORSEUIL, HENRY X.; ALVAREZ, P. J. J. Natural bioremediation perspective for BTX-contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. **Wat. Sci. Tech.**, v. 34, p.311-318, 1996.

CORSEUIL, H. X.; WEBER, W. J. Jr. Potential biomass limitations on rates of degradation on monoaromatic hydrocarbons by indigenous microbes in subsurface soils. **Water Research**, v.28, p.1415-1423, 1994.

COSTA, M. R. **Uso da respirometria para avaliação da biodegradação aeróbia de lixo de resíduos sólidos urbanos em latossolo vermelho-escuro**. Brasília: UnB, 2009. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresource Technology**, 102, 2–9, 2011.

CYPLIK, P.; SCHMIDT, M.; SZULC, A.; MARECIK, R.; LISIECKI, P.; HEIPIEPER, H.J.; OWSIANIAK, M.; VAINSHTEIN, M.; CHRZANOWSKI, Ł. Relative quantitative PCR to assess bacterial community dynamics during biodegradation of diesel and biodiesel fuels under various aeration conditions. **Biores. Technol.** 102, 4347–4352, 2011.

DAL MAGRO, C. et al Chromium (VI) biosorption and removal of chemical oxygen demand by *Spirulina platensis* from wastewater-supplemented culture medium. **Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 47, n. 12, p. 1818-1824, 2012.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetable resources to microorganisms: new trends in surfactants. **C. R. Chimie**, 7, 641–646, 2004.

DERNER, R. B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados**. Florianópolis: UFSC, 2006. Tese de doutorado em Ciência dos Alimentos.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M.; Microbial Production of Surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, 47-64, 1997.

DILLON, J. C.; PHUN, A. P.; DUBACQ, J. P. Nutritional Value of the Alga *Spirulina*. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 77, p. 32-46, 1995.

FOLCH, J. ; LEES, M. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 226, p. 497-509, 1957.

FRANKENBERGER, JR.; W.T. the need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons. In CALABRESE, E.J.; KOSTECKI, P.T. *Hydrocarbon contaminated soils and groundwater*. V 2. P. 237-293. 1992.

GOJGIC-CVIJOVIC, G. D.; MILIC, J. S.; SOLEVIC, T. M.; BESKOSKI, V. P.; ILIC, M. V.; DJOKIC, L. S.; NARANCIC, T. M.; VRVIC, M. M. Biodegradation of petroleum sludge and petroleum polluted soil by a bacterial consortium: a laboratory study. *Biodegradation*, 23:1–14, 2012.

GOKHALE, S.V.; JYOTI, K.K.; LELE, S.S. Modeling of chromium (VI) biosorption by immobilized *Spirulina platensis* in packed column. *Journal of Hazardous Materials*, v.170, p. 735- 743, 2009.

GOLMAKANI, M.; et al. Effect of Alternative C₂ Carbon Sources on the Growth, Lipid, and γ -Linolenic Acid Production of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*). *Food Sci. Biotechnol.* 21(2): 355-363 (2012).

GRIMA, M. et al. A mathematical model of microalgal growth in light-limited chemostat culture. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, n° 61, p. 167-173, 1994.

HANAA, H. A. B.; GAMAL, S. B.; ABDERRAHIM, B.; MERCEDES, M. ARACIL, J. Enhancement of lipid accumulation in *Scenedesmus obliquus* by Optimizing CO₂ and Fe³⁺ levels for biodiesel production. *Bioresource Technology*: 119, 429–432, 2012.

HENRIKSON, R. **Microalga Spirulina – Superalimento del futuro**. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, ISBN 84-7953-047-2, 1994.

HU, Q.; et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*: 54, 621–639, 2008.

HUANG, G.; et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, 87, 38–46, 2010.

JOSHI, S. et al. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresource Technology*, 99, 195–199, 2008.

KACZOREK, E.; MOSZYN'SKA, S.; OLSZANOWSKI, A. Modification of cell surface properties of *Pseudomonas alcaligenes* S22 during hydrocarbon biodegradation. *Biodegradation*, 22:359–366, 2011.

KITAMOTO, D.; et al. Functions and potential applications of Glycolipid Biosurfactants – from Energy-saving Materials to Gene delivery carriers. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 94, n. 3, 187-201, 2002.

LEE, M. D. et al. Bioremediation of aquifers contaminated with organic compounds. *CRC Critical Reviews in Environmental Control*, V. 1. p.29-89, 1988.

LIMA, U.A.; et al. **Biotechnologia industrial** – vol.3. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

LIN, C.T.; et al. Evaluation of the optimal strategy for ex situ bioremediation of diesel oil-contaminated soil. *Environ Sci Pollut Res*.18:1487–1496, 2011.

LIN, S.C. Biosurfactants: Recent advances – review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. vol. 66, p. 109-120, 1996.

LIU, Z.; et al. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, n. 99, p. 4717 – 4722, 2008.

LOURENCO, Sergio O. **Cultivo de Microalgas Marinhas** - Princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2006.

MACEDO, R. V. T.; ALEGRE, R. M. Influência no cultivo de *Spirulina máxima* em dois níveis de temperatura – parte II: produção de lipídios. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 21(2), 183-186, maio-ago. 2001.

MAIER, R. M. Biosurfactants: Evolution and diversity in bacteria. *Advances in Applied Microbiology*. v. 52, p. 101-121, 2003.

MAKKAR, R. S.; et al. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*, 1:5, 2011.

MARIANI, P. D. S. C. **Estudo da biodegradação da blenda de Poli (ϵ caprolactona) e amido modificado em meios sólido e líquido**. Campinas: UNICAMP, 2005. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química.

MARIANO, A. P., TOMASELLA, R. C., MARCONDES DE OLIVEIRA, L., CONTIERO, J., DE ANGELIS, F. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. *African Journal of Biotechnology*. v.7, p.1323-1328, 2008.

MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M.; PIRÔLLO, M. P. S.; CONTIERO, J. **Biodegradability of commercial and weathered diesel oils**. In: XXII Interamerican Congress of chemical Engineering. Anais, Buenos Aires, 2006b.

MARQUEZ-ROCHA et al. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *J Ferment Bioeng*, 76:408–410, 1993.

MARTINS, V. G. et al. Solid State Biosurfactant Production in a Fixed-Bed Column Bioreactor. *Z. Naturforsch*, 61c, 721-726, 2006.

MATHEW, M. et al. Bioremediation of 6% [w/w] diesel-contaminated Mainland soil in Singapore; comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Engineering Life Science*, v. 6, n. 1, p. 63-67, 2006.

MATSUURA, A. B. J. **Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação**. Campinas: UNICAMP, 2004. Tese de doutorado em Ciência dos Alimentos.

MENEGHETTI, L. R. R. **Bioremediação na descontaminação de solo residual de basalto contaminado Com óleo diesel e biodiesel**. Passo Fundo: UPF, 2007. Dissertação de Mestrado em Engenharia, área de concentração Infraestrutura e Meio Ambiente.

MENG, X.; et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy* 34, 1–5, 2008.

MEZZOMO, A. G. et al. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 30(1), 173-178, jan.-mar. 2010.

MEURER, E. J. **Fundamentos de química do solo**. Porto Alegre: Gênese, 2000.

MILLIOLI, V. S.; SÉRVULO, E. F.; SOBRAL, L. G. S.; CARVALHO, D. D. Biorremediação de solo contaminado com óleo cru: avaliação da adição de ramnolípido quanto à toxicidade e a eficiência de biodegradação. **CT2007-031-00** – Com. Técnica para o 4º Congresso Brasileiro de P&D em petróleo e gás. Campinas, 2007.

MONTERO, M. F. et al. Isolation of high-lipid content strains of the marine microalga *Tetraselmis suecica* for biodiesel production by flow cytometry and single-cell sorting. *Appl. Phycol.*, 23:1053–1057, 2011.

MORAIS, M. G. e COSTA, J. A. V. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina sp.* and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, v. 129, p. 439 - 445, 2007.

MORAES, B. EDUARDO; TORNISIELO, T.M. SÂNIA. Biodegradation of Oil Refinery Residues Using Mixed- Culture of Microorganisms Isolated from a Landfarming. *Brazilian archives of Biology and technology*. V.52, n. 6: p. 1571-1578, 2009.

MOREIRA, F. M. S. e SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Ed. UFLA, 2002.

MOROCHO-JÁCOME, A. L.; et al. Otimização da produção de biomassa de *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* em fotobiorreatores tubulares. **III Simpósio Intercâmbio Brasil-Japão em Sustentabilidade: Um desafio da humanidade**. Campo Grande/MS, 2010.

MULLIGAN, C. N.; Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133, 183–198, 2005.

MULTITERNO, A.; et al. Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* em batelada alimentada. *Ciênc. agrotec., Lavras*, v. 29, n. 6, p. 1132-1138, nov./dez., 2005.

MURALIDHAR, R. V; et al. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. *Biochemical Engineering Journal*, v. 9, p. 17-23, 2001.

MUTHUSAMY, K.; et al. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. *Current Science*, v. 94, n. 6, 25, mar/2008.

MYERS J.; BURR, G.O. Studies on photosynthesis, some effects of light of high intensity on *Chlorella*. *J. Gen. Physiol.*, 24:45–67, 1940.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M.; Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Quim. Nova*, v.25, n. 5, 772-776, 2002.

PACWA-PLOCINACZAK, M. et al.; Environmental applications os Biosurfactants: Recent advances. *Int. J. Mol. Sci.*, 12, 6332-654, 2011.

PELIZER, L. H. et al. *Spirulina platensis* growth estimation by pH determination at different cultivations conditions. *Electronic Journal of Biotechnology*: v.5, n.3, 2002.

PÉREZ, H. E. B. Biodiesel de microalgas. **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN**, p. 1-19, 2007.

PEDROTI, G. I. **Ensaio de Biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados do petróleo em solos**. Vitória: UFES, 2007. Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental.

PINHO, M. A. **Meio de cultivo a base de concentrado de dessalinização obtido por osmose inversa para *Arthrospira (Spirulina) platensis***. Florianópolis: UFSC, 2009. Dissertação em Ciência dos Alimentos.

POSSATTO, A. R. **Microalgas como matéria-prima para produção de biodiesel: uma revisão**. Ijuí: UNIJUÍ, 2009. Monografia Pós-graduação *latu-sensu* em Biocombustíveis.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. *Microbiology*. Boston: McGraw-Hill, 1999.

PRIETTO, P. D.; REGINATTO, C.; KORF, E. P.; THOMÉ, A.; CANSOLI, N.C. Comportamento hidráulico e reativo de uma mistura solo-cimento para barreiras de fundo em aterros de resíduos sólidos, in: **Congresso Brasileiro de Mecânica dos Solos e Engenharia Geotécnica**, 15 ed., ABMS, Gramado, RS, Brasil. “CD-ROM”, 2010.

RABUS, R.; HEIDER, J. Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate-reducing bacteria. *Archives of Microbiology*, v. 170, p. 377-384, 1998.

RADMANN, E. M. et. al., Cultivo de microalgas para a biofixação de CO₂ e obtenção de biocombustíveis. **Anais XVIII Sinaferm**, Caxias do Sul, 2011.

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

RAVEN, P. H.; et al. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 7 ed., 2005. 856 p.

Refinaria Alberto Pasqualini- REFAP. **Óleo diesel**. Disponível em: <http://www.refap.com.br/produtos_diesel.asp>. Acesso em 28/Dez/2010.

REGINATTO, C. **Bioventilação em um solo argiloso contaminado com mistura de diesel e biodiesel**. Passo Fundo: UPF, 2012. Dissertação de Mestrado em Engenharia, área de concentração Infraestrutura e Meio Ambiente.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Blackwell Science, Oxford, UK, 2004. 566 p.

RIVALDI, J. D.; et. al. Glicerol de biodiesel: Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*: n. 37, p. 44-51, 2007.

RIZZO, A. C. L. et al.. Preliminary identification of the bioremediation limiting factors of a clay bearing soil contaminated with crude oil. *J. Braz. Chem. Soc. [online]*, vol.19, n.1, p. 169-174, 2008.

RODRIGUES, L. et al. Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance*, 57, 609-618, 2006.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2ª ed. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, p. 249-252, 2002.

ROSA, et. al. Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. *Energy Conversion and Management*, v. 52, 3071-3073, 2011.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 154–162, 1999.

SAIMMAI, A.; KAEWRUENG, J.; MANEERAT, S. Used lubricating oil degradation and biosurfactant production by SC-9 consortia obtained from oil-contaminated soil. *Ann Microbiol.* DOI 10.1007/s13213-012-0434-7, 2012.

SANTANA, C. P.; et al. Estudo da produção de biossurfactante utilizando como substrato o fruto da palma forrageira. **VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, Uberlândia – MG, 2009.

SANTOS, L. C.; MILIOLI, V. S. Avaliação da potencialidade do uso de biossurfactante na biorremediação de solo contaminado por óleo cru. **Anais XI JIC**, 2003.

SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. (2005) Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. *Environmental Pollution*, 136: 187 – 195.

SEABRA, P.N. **Uso da biorremediação em áreas impactadas pela indústria de petróleo**. Rio de Janeiro, CENPES, 2001.

- SEMPLE, K.T.; Reid, B.J.; Fermor, T.R. Impact of composting strategies on treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution*, 112:269-283, 2000.
- SERRANO, A.; GALLEGO, M.; GONZÁLEZ, J.L.; TEJADA, M. Natural Attenuation of diesel aliphatic hydrocarbons in contaminated agricultural soil. *Environment Pollution: in press*, 2007.
- SILVA, T. A. L. et al. Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 utilizando milho-cina como substrato. *Exacta*, v. 8, n. 1, 19-26, 2010.
- SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *TRENDS in Biotechnology*, v. 22, n.3, 142-146, 2004.
- SIVA KIRAN, R. R. et al. Bioaccumulation of Cadmium in Blue Green Algae *Spirulina (Arthrospira) indica*. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, v. 3, n. 3, p. 1-4, 2012.
- SCOTT, S. A. et al. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 277-286, 2010.
- SOOPPER, W.E. **Municipal Sludge use in Land Reclamation**. Boca Raton, CRC Press. 163, 1993.
- SPINELLI, LEANDRO. DE FREITAS. **Biorremediação, Toxicidade e Lesão Celular em derrames de gasolina**. 2005. Tese (Doutorado em Engenharia/Civil) – Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- STRECK, E. V. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2. ed. Porto Alegre: EMATER/RS, Brasil, 2008.
- STUCKI, J.W.; LEE, K.; GOODMAN, B.A.; KOSTKA, J.E. Effects of *in situ* biostimulation on iron mineral speciation in a sub-surface soil. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71:835-843, 2007.
- SUTHERSAN, S. S. **Remediation Engineering**. CRC Press LLC, 2000.
- SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Microbial Biosurfactants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 112, 615-616, 2010.
- SYLVIA D. M. et al. **Principles and Applications of Soil Microbiology**. New Jersey. 2 Ed, Prentice Hall, 2004.
- TAKAGI, M.; et al. Effect of salt concentration on Intracellular Accumulation of lipids and Triacylglyceride in Marine *Microalgae Dunaliella Cells*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.101, n.3, 223-226, 2006.
- TAPAJÓS, P. B. A. et al. **Estudo da mobilidade e da biodegradação de um óleo mineral em solos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 205 p., 2008.

TAUK, S.M. Biodegradação de resíduos orgânicos no solo. *Revista Brasileira de Geociência*, v 20, n ., 299-301, 1990.

TELES, C.R. Monitoramento da Biodegradação Aeróbia de Lodo de Esgoto em Solo via Modelos Matemáticos. **VIII Simpósio Italo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. 2006.

TEIXEIRA, C. M. **Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. Biodiesel o novo combustível do Brasil**. 91-96, 2008.

TEIXEIRA, C. M. L. L. et al. **Um Novo Sistema de Cultivo de Microalgas para a produção de Biodiesel**. 2010.

TENG, Y; XU, Y. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rizopus chinensis* using statistical method. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3900-3907, 2008.

TOMASELLI, L. Morphology, Ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira (Spirulina) maxima* and *Arthrospira (Spirulina) platensis*. **IN: VONSAHK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology***. London: Taylor & Francis, 1-16, 1997.

TORZILLO, G.; SACCHI, A.; MATERASI, R. Temperature as an important factor affecting productivity and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. *Bioresource Technology*, v. 38, 95-100, 1991.

TRINDADE, P. V. O. **Avaliação das técnicas de bioaumentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo**. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002.

UENO, Y., et al. Ethanol production by dark fermentation in the marine green alga, *Chlorococcum littorale*. *J. Ferment. Bioeng.* 86, 38-43, 1998.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Microbial processes affecting monitored natural attenuation of contaminants in the subsurface. **EPA/540/S-99/001**. Ada, Oklahoma, 1999.

USEPA, U. S. Environmental protection agency, 1996. **Method 3050B**. Disponível em: . Acesso em: Nov/2011.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor & Francis, 252 p., 1997.

VONSHAK, A., CHEUNG, S. M.; CHEN, F. Mixotrophic growth modifies the response of *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Cyanobacteria) cells to light. *Journal of Phycology*, 36: 675-679, 2000.

XUAN, J.; LEUNG, M.K.H.; LEUNG, D.Y.C.; MENG, N. A review of biomass-derived fuel processors for fuel cell systems. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 13, n. 6-7, p. 1301- 1313, 2009.

Formatado: Fonte: Negrito

Formatado: Fonte: Negrito, Itálico

YOUNG, L. Y. Anaerobic degradation of aromatic compounds. **Microbial degradation of aromatic compounds**. GIBSON, D. T. (ed.). Marcel-Dekker-Inc., New York, pp. 487-523, 1984.

WHANG et al. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *J. Hazard. Mater.*, 151, 155–163, 2008.

WIJFFELS, R.H.; BARBOSA, M.J. *An Outlook on Microalgal Biofuels*. *Science*, v. 329, n. 5993, p. 796-799, 2010.

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

ANEXO 1 – MEIO ZARROUK

Meio Zarrouk

O Meio Zarrouk é o meio de cultivo para *Spirulina platensis* (ZARROUK, 1966).

<i>Nº</i>	<i>Reagentes</i>		<i>5L</i>
01	NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio	84,0
02	K ₂ HPO ₃	Fosfato de Potássio	2,5
03	NaNO ₃	Nitrato de Sódio	12,5
04	K ₂ SO ₄	Sulfato de Potássio	5,0
05	NaCl	Cloreto de Sódio	5,0
06	MgSO ₄	Sulfato de Magnésio	1,0
07	CaCl ₂	Cloreto de Cálcio	0,2
08	FeSO ₄	Sulfato ferroso	0,05
09	EDTA	EDTA	0,4
10	Sol A	Sol A	5 ml
11	Sol B ₆	Sol B ₆	5 ml

OBS: Todos os reagentes devem ser pesados e diluídos em água destilada e autoclavados. Para isso deve-se utilizar erlen de 250 mL com 200 ml de água destilada com exceção do nº 8 (Sulfato Ferroso) que deve ser autoclavado separado da água. O reagente nº 1 (bicarbonato de sódio) necessita de um erlen maior (2 L) o qual se dilui com 1 L de água destilada. O meio deve ser acondicionado em balão volumétrico de 5 L, no qual pode ser autoclavado o restante da água para que se complete 5 L (2,4 L). Após autoclavados os reagentes, devem ser misturados em ordem e por fim adicionadas as soluções A e B₆.

ANEXO 2 – MÉTODO PARA EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDIOS

Metodologia para extração e quantificação de lipídios de microalgas Método de Folch e Lees (1956) adaptado segundo Colla et. al. (2004)

- Pesar 0,5g de amostra
- adicionar 5 mL de clorofórmio:metanol (2:1)
- agitar em ultrassom durante 5 min e centrifugar a 10.000 rpm durante 10 minutos;
- recolher o sobrenadante com uma pipeta e repetir os passos 3x.
- filtrar os sobrenadantes em papel filtro, lavando o filtro com 10 mL da mistura de reagentes;
- em um funil de separação, adicionar $\frac{1}{4}$ do volume de KCl 0,88%. Misturar cuidadosamente. Na separação de fases, utilizar a fase inferior.
- novamente no funil, adicionar $\frac{1}{4}$ do volume de metanol:água (2:1), agitar cuidadosamente e na separação de fases utilizar a fase inferior.
- filtrar em sulfato de sódio anidro;
- colocar o filtrado em um balão de fundo chato (previamente tarado e pesado) e evaporar o solvente em rotaevaporador.
- levar a estufa à 50° C até peso constante (\cong 2 h).
- determinar o % de lipídios em g 100⁻¹ de biomassa.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO

Revista CIATEC – UPF, vol.4 (1), p.p.48-60, 2012

APLICAÇÕES AMBIENTAIS DE MICROALGAS

ENVIRONMENTAL APPLICATIONS OF MICROALGAE

Roberta Schmitz¹, Clinei Dal Magro², Luciane Maria Colla^{3*}

¹Bióloga. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia/Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo. E-mail: roberta.schmitz@bol.com.br

²Engenheiro Ambiental. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia/Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo. E-mail: clineidalmagro@gmail.com

³Engenheira de Alimentos. Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, Professora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia, Universidade de Passo Fundo. E-mail: lmcolla@upf.br

*Autor para correspondência: Campus I, Prédio L1, Universidade de Passo Fundo - BR 285, Bairro São José - Passo Fundo/RS, CEP: 99052-900 - Cx. Postal 611 - Fone: (54) 3316-8193

RESUMO

As microalgas tem sido foco de muitos estudos nos últimos anos tendo em vista sua grande aplicabilidade na indústria de alimentos e farmacêutica, nas áreas da biomedicina e ambiental. As aplicações ambientais das microalgas incluem a biofixação de CO₂, remoção de matéria orgânica e metais tóxicos de efluentes, produção de biocombustíveis como biodiesel e bioetanol e na produção de moléculas de origem lipídica com capacidade surfactante entre outros. Dentre as microalgas estudadas, a *Spirulina platensis* tem apresentado grande potencial de utilização em todos esses setores com destaque especial na área ambiental. Objetivou-se revisar as principais aplicações ambientais dos cultivos microalgais, com ênfase para a microalga *Spirulina platensis*.

Palavras-chave: microalgas; aplicações ambientais; *Spirulina platensis*.

ABSTRACT

Microalgae have been focus of many studies in recent years due to its wide applicability in food and pharmaceutical industries and in biomedical and environmental areas. The environmental applications of microalgae include the biofixation of CO₂, in the removal of organic matter and toxic metals from wastewater, in the biofuels production, as biodiesel and bioethanol, and in the production of lipid molecules with surfactant activity, among others. Among the studied microalgae, *Spirulina platensis* has shown great potential in all these sectors with particular emphasis in the environmental area. The objective was to review the main environmental applications of microalgae cultures, with emphasis on *Spirulina platensis*.

Keywords: microalgae, environmental applications, *Spirulina platensis*.

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com as questões ambientais tem se tornado cada vez mais evidentes em função da demasiada utilização de recursos naturais em processos produtivos, acarretando assim, um elevado potencial de poluição desses recursos pelas indústrias (BARCELLOS et al., 2009).

A crescente demanda por produtos e serviços tem elevado drasticamente a atividade industrial, gerando cada vez mais resíduos e elevando a utilização dos recursos naturais, os quais estão tornando-se escassos e muitas vezes encontram-se poluídos e degradados (DAL MAGRO et al., 2011). Diante desse cenário, busca-se aliar desenvolvimento econômico com proteção ambiental, desenvolvendo-se novos produtos, novas alternativas de processos e técnicas eficientes no combate e remediação da poluição, tornando assim, a atividade industrial menos impactante ao meio ambiente.

APÊNDICE B – CRESCIMENTO CELULAR

Tabela 1. Acompanhamento do Crescimento celular – *Spirulina platensis*, cepa Paracas (PFC 2^o)

<i>Experimento</i>	<i>0</i>	<i>3 d</i>	<i>6 d</i>	<i>9 d</i>	<i>13 d</i>	<i>16 d</i>	<i>20 d</i>	<i>23 d</i>	<i>27 d</i>	<i>30 d</i>
<i>1 - controle</i>	0,26	0,41	0,63	1,01	1,82	2,34	2,59	3,11	3,72	4,23
<i>2 - ferro</i>	0,28	0,38	0,63	1,13	1,97	2,63	3,51	4,12	4,13	4,07
<i>3 - glicerol</i>	0,27	0,36	0,62	1,06	2,36	2,84	3,45	2,90	4,14	4,36
<i>4 - ferro + glicerol</i>	0,26	0,38	0,62	0,97	1,66	2,14	3,05	3,35	3,71	4,12
<i>5 - PC₁</i>	0,26	0,38	0,59	1,11	2,04	2,54	3,97	4,56	4,79	5,11
<i>6 - PC₂</i>	0,26	0,39	0,64	0,95	2,01	2,49	3,17	3,19	3,71	3,84
<i>7 - PC₃</i>	0,27	0,39	0,66	1,00	2,33	2,76	3,48	3,25	3,97	4,19
<i>8 - PC₄</i>	0,27	0,36	0,64	1,02	3,08	3,19	4,02	4,03	5,69	5,70

Tabela 2. Acompanhamento do Crescimento celular – *Spirulina platensis*, cepa Paracas (PFC 2³)

Experimento	0	2 d	5 d	7 d	9 d	12 d	14 d	15 d	19 d	22 d	26 d	29 d
<i>1 - controle</i>	0,23	0,22	0,33	0,49	0,65	0,78	0,93	1,01	1,72	1,52	2,79	2,43
<i>2 - glicose</i>	0,23	0,21	0,36	0,47	0,65	1,07	1,29	1,82	2,89	2,41	3,37	2,92
<i>3 - ferro</i>	0,23	0,25	0,46	0,60	0,64	0,85	0,99	1,08	1,88	1,66	3,00	2,63
<i>4 - glicose + ferro</i>	0,23	0,24	0,41	0,54	0,63	0,88	1,31	1,69	1,98	1,98	4,27	2,83
<i>5 - glicerol</i>	0,21	0,24	0,38	0,47	0,62	0,82	0,87	1,04	1,76	1,33	2,94	2,39
<i>6 - glicerol + glicose</i>	0,23	0,21	0,33	0,40	0,64	0,75	1,05	1,16	1,90	2,15	2,95	2,93
<i>7 - glicerol + ferro</i>	0,22	0,30	0,41	0,47	0,67	0,78	0,94	1,12	1,65	1,55	3,05	2,46
<i>8 - glicose + ferro + glicerol</i>	0,24	0,26	0,40	0,47	0,63	0,92	1,21	1,79	1,91	1,72	3,34	2,93
<i>9 - PC₁</i>	0,24	0,23	0,36	0,40	0,65	0,76	1,28	1,76	2,15	1,67	3,01	2,96
<i>10 - PC₂</i>	0,21	0,23	0,33	0,39	0,63	0,88	1,09	1,20	1,83	1,57	3,44	2,98
<i>11 - PC₃</i>	0,22	0,22	0,33	0,37	0,65	0,78	0,91	1,11	2,00	1,79	3,34	2,84

Tabela 3. Acompanhamento do Crescimento celular – *Spirulina platensis*, cepa LEB-52 (PFC) 2³

Experimento	0	3 d	6 d	10 d	13 d	17 d	20 d	24 d	27 d	31 d	33 d
<i>1 - controle</i>	0,24	0,41	0,57	0,83	1,65	1,84	2,1	2,4	2,73	2,86	3,02
<i>2 - glicose</i>	0,22	0,38	0,52	1,59	2,04	2,49	2,64	3,07	3,57	3,63	3,69
<i>3 - ferro</i>	0,24	0,44	0,53	0,8	1,57	1,76	2,01	2,3	2,65	2,63	2,74
<i>4 - glicose + ferro</i>	0,25	0,4	0,52	1,6	1,96	2,29	2,71	2,99	3,39	3,34	3,44
<i>5 - glicerol</i>	0,25	0,42	0,54	0,86	1,69	1,98	2,51	2,87	3,11	3,20	3,20
<i>6 - glicerol + glicose</i>	0,24	0,33	0,54	0,87	1,85	1,96	2,47	2,76	3,08	3,11	3,67
<i>7 - glicerol + ferro</i>	0,25	0,33	0,50	0,97	1,96	2,04	2,07	2,23	2,63	2,42	2,61
<i>8 - glicose + ferro + glicerol</i>	0,22	0,51	0,50	0,84	1,71	2,18	2,72	3,20	3,71	3,83	3,75
<i>9 - PC₁</i>	0,23	0,28	0,54	0,93	1,86	2,19	2,44	2,70	3,02	3,51	3,16
<i>10 - PC₂</i>	0,21	0,25	0,52	0,96	1,88	2,10	2,41	2,60	2,85	3,02	3,29
<i>11 - PC₃</i>	0,24	0,27	0,54	0,90	1,93	2,34	2,38	3,05	4,00	3,77	4,30

APÊNDICE C – DETERMINAÇÃO DE LIPÍDIOS

Tabela 1. Percentual de lipídios obtidos *Spirulina platensis*, cepa Paracas (PFC 2³)

<i>Exp.</i>	<i>Biomassa</i>	<i>balão</i>	<i>balão + lipídios</i>	<i>% lipídios</i>	<i>Média - Desv. pad.</i>	<i>CV</i>
1A	0,302	100,7558	100,7779	7,32	6,81±0,71	10,57
1B	0,300	107,107	107,1259	6,30		
2A	0,302	107,0992	107,119	6,56	6,45±0,14	2,31
2B	0,301	100,762	100,7811	6,35		
3A	0,302	115,8125	115,8386	8,64	8,63±0,02	0,27
3B	0,302	107,039	107,065	8,61		
4A	0,300	100,7585	100,7797	7,07	7,05±0,01	0,23
4B	0,301	135,2134	135,2346	7,04		
5A	0,301	134,0068	134,0292	7,44	7,04±0,57	8,12
5B	0,300	107,1043	107,1242	6,63		
6A	0,302	115,8123	115,8377	8,41	8,42±0,01	0,23
6B	0,301	100,7584	100,7838	8,44		
7A	0,303	134,004	134,0332	9,64	9,50±0,18	1,99
7B	0,301	107,0383	107,0665	9,37		
8A	0,300	135,2152	135,2438	9,53	9,10±0,60	6,69
8B	0,301	107,1021	107,1282	8,67		
9A	0,302	134,0068	134,0212	4,77	4,79±0,03	0,72
9B	0,301	107,0388	107,0533	4,82		
10A	0,301	115,8152	115,8312	5,32	5,27±0,07	1,33
10B	0,301	107,0417	107,0574	5,22		
11A	0,303	107,1052	107,1138	2,84	3,32±0,68	20,48
11B	0,300	135,217	135,2284	3,80		

Tabela 2. Percentual de lipídios obtidos *Spirulina platensis*, cepa Paracas (PFC 2²)

<i>Exp.</i>	<i>Biomassa</i>	<i>balão</i>	<i>balão + lipídios</i>	<i>% lipídios</i>	<i>Média - Desv. pad.</i>	<i>CV</i>
1A	0,302	102,319	102,3359	5,60	5,73±0,18	3,297
1B	0,307	106,8016	106,8196	5,86		
2A	0,304	126,4682	126,4864	5,99	5,88±0,07	1,731
2B	0,305	101,9491	101,9667	5,77		
3A	0,301	107,1034	107,1167	4,42	4,46±0,06	1,393
3B	0,304	101,6527	101,6664	4,51		
4A	0,307	88,3233	88,3356	4,01	3,99±0,02	0,584
4B	0,302	124,1380	124,1500	3,97		
5A	0,301	101,6561	101,6706	4,82	4,68±0,20	4,294
5B	0,300	107,1063	107,1199	4,53		
6A	0,301	126,4752	126,4927	5,81	5,88±0,09	1,597
6B	0,301	88,3249	88,3428	5,95		
7A	0,302	106,8057	106,8212	5,13	5,12±0,01	0,223
7B	0,301	101,957	101,9724	5,12		

8A	0,305	102,3221	102,3373	4,98	4,92±0,09	1,885
8B	0,305	124,1414	124,1562	4,85		

Tabela 3. Percentual de lipídios obtidos *Spirulina platensis*, cepa LEB-52 (PFC 2³)

<i>Exp.</i>	<i>Biomassa</i>	<i>balão</i>	<i>balão + lipídios</i>	<i>% lipídios</i>	<i>Média - Desv. pad.</i>	<i>CV</i>
1A	0,302	104,1132	104,1249	3,87	3,71±0,23	6,313
1B	0,302	89,2035	89,2142	3,54		
2A	0,302	108,3265	108,3406	4,67	4,55±0,17	3,772
2B	0,305	88,9007	88,9142	4,43		
3A	0,301	102,9216	102,9324	3,59	3,48±0,15	4,515
3B	0,306	101,4897	101,5000	3,37		
4A	0,300	99,3198	99,3307	3,63	3,49±0,20	5,858
4B	0,305	135,218	135,2282	3,34		
5A	0,304	102,8858	102,8978	3,95	4,06±0,15	3,915
5B	0,302	89,4038	89,4164	4,17		
6A	0,305	107,1077	107,1202	4,10	4,28±0,25	5,903
6B	0,303	94,4018	94,4153	4,46		
7A	0,304	107,042	107,0495	2,47	2,35±0,16	7,154
7B	0,305	100,7632	100,7700	2,23		
8A	0,300	101,6342	101,6443	3,37	3,40±0,04	1,373
8B	0,300	156,0392	156,0495	3,43		
9A	0,306	106,801	106,8218	6,73	6,64±0,12	1,870
9B	0,302	88,322	88,3421	6,56		
10A	0,304	102,839	102,8602	6,94	6,86±0,11	1,695
10B	0,304	88,871	88,8916	6,78		
11A	0,302	105,276	105,296	6,62	6,87±0,34	5,016
11B	0,301	103,938	103,9591	7,11		

APÊNDICE D – DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES EMULSIFICANTES

Quadro 1. AE OA Paracas (PFC 2³)

1A E 1B							
	leitura 1	leitura 2	leitura 3	<i>Média</i>	<i>E24</i>	lipídio (mg)	<i>UE/mg lip</i>
1A1	1,821	1,777	1,751	1,783	1,017	16,9	1,204
1A2	1,87	1,858	1,857	1,861	1,096	16,9	1,297
1A3	1,849	1,842	1,827	1,839	1,073	16,9	1,270
							1,257
1B1	1,879	1,87	1,866	1,871	1,106	18,0	1,229
1B2	1,862	1,854	1,849	1,855	1,089	18,0	1,210
1B3	1,87	1,863	1,851	1,861	1,095	18,0	1,217
							1,219
2A E 2B							
	leitura 1	leitura 2	leitura 3	<i>Média</i>	<i>E24</i>	lipídio (mg)	<i>UE/mg lip</i>
2A1	2,022	2,008	2,002	2,010667	1,2451	18,2	1,368254
2A2	2,144	2,12	2,127	2,130333	1,3648	18,2	1,499756
2A3	2,001	2,095	2,096	2,064	1,2984	18,2	1,426862
							1,431624
2B1	1,913	1,902	1,901	1,905333	1,1398	17,6	1,295202
2B2	1,855	1,849	1,839	1,847667	1,0821	17,6	1,229672
2B3	2,057	2,095	2,047	2,066333	1,3008	17,6	1,478157
							1,334343
3A E 3B							
	leitura 1	leitura 2	leitura 3	<i>Média</i>	<i>E24</i>	lipídio (mg)	<i>UE/mg lip</i>
3A1	1,845	1,848	1,845	1,846	1,0804	13,3	1,624728
3A2	1,58	1,552	1,567	1,566333	0,8008	13,3	1,204177
3A3	1,432	1,433	1,428	1,431	0,6654	13,3	1,000668
							1,276525
3B1	1,333	1,28	1,275	1,296	0,5304	13,7	0,774371
3B2	2,076	2,08	2,069	2,075	1,3094	13,7	1,911598
3B3	1,399	1,393	1,391	1,394333	0,6288	13,7	0,917924
							1,201298
4A E 4B							
	leitura 1	leitura 2	leitura 3	<i>Média</i>	<i>E24</i>	lipídio (mg)	<i>UE/mg lip</i>
4A1	2,002	2,023	2,018	2,014333	1,2488	12,3	2,030533
4A2	1,535	1,531	1,527	1,531	0,7654	12,3	1,244625
4A3	1,888	1,889	1,885	1,887333	1,1218	12,3	1,824029
							1,699729
4B1	2,021	2,034	2,033	2,029333	1,2638	12	2,106296
4B2	1,385	1,38	1,376	1,380333	0,6148	12	1,02463
4B3	2,148	2,139	2,145	2,144	1,3784	12	2,297407
							1,809444

5A E 5B							
	leitura 1	leitura 2	leitura 3	<i>Média</i>	<i>E24</i>	lipídio (mg)	<i>UE/mg lip</i>
5A1	1,699	1,694	1,691	1,694667	0,9291	14,5	1,281533
5A2	1,892	1,894	1,888	1,891333	1,1258	14,5	1,552797
5A3	1,897	1,898	1,896	1,897	1,1314	14,5	1,560613
							1,464981
5B1	1,87	1,874	1,866	1,87	1,1044	13,6	1,624183
1B2	1,725	1,717	1,718	1,72	0,9544	13,6	1,403595
1B3	1,879	1,867	1,875	1,873667	1,1081	13,6	1,629575
							1,552451
6A E 6B							
	leitura 1	leitura 2	leitura 3	<i>Média</i>	<i>E24</i>	lipídio (mg)	<i>UE/mg lip</i>
6A1	2,336	2,35	2,347	2,344333	1,5788	17,5	1,804317
6A2	2,097	2,099	2,095	2,097	1,3314	17,5	1,521651
6A3	2,375	2,938	2,4	2,571	1,8054	17,5	2,063365
							1,796444
6B1	2,328	2,326	2,327	2,327	1,5614	17,9	1,744631
6B2	2,113	2,115	2,124	2,117333	1,3518	17,9	1,510366
6B3	2,211	2,209	2,21	2,21	1,4444	17,9	1,613904
							1,622967
7A E 7B							
	leitura 1	leitura 2	leitura 3	<i>Média</i>	<i>E24</i>	lipídio (mg)	<i>UE/mg lip</i>
7A1	2,111	2,109	2,108	2,109333	1,3438	15,5	1,733907
7A2	2,261	2,265	2,264	2,263333	1,4978	15,5	1,932616
7A3	1,908	1,905	1,904	1,905667	1,1401	15,5	1,471111
							1,712545
7B1	2,027	2,024	2,022	2,024333	1,2588	15,4	1,634776
7B2	1,929	1,983	1,928	1,946667	1,1811	15,4	1,533911
7B3	1,918	1,925	1,92	1,921	1,1554	15,4	1,500577
							1,556421
8A E 8B							
	leitura 1	leitura 2	leitura 3	<i>Média</i>	<i>E24</i>	lipídio (mg)	<i>UE/mg lip</i>
8A1	2,065	2,064	2,06	2,063	1,2974	15,2	1,707164
8A2	2,115	2,111	2,109	2,111667	1,3461	15,2	1,771199
8A3	1,194	1,195	1,193	1,194	0,4284	15,2	0,563743
							1,347368
8B1	2,265	2,266	2,264	2,265	1,4994	14,8	2,026276
8B2	1,104	1,196	1,079	1,126333	0,3608	14,8	0,487538
8B3	1,906	1,903	1,902	1,903667	1,1381	14,8	1,537988
							1,350601

Quadro 2. AE AO Paracas (PFC 2^o)

1AE 1B								
		Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Leitura 4	média	mg _{lipídio}	UE/ _{mg} lipídio
1A1	E	25,09	25,10	25,10	25,38	25,17		

	T	61,03	61,11	61,11	61,13	61,10	16,9	41,87665
1A2	E	23,80	23,70	23,90	23,87	23,82		
	T	62,68	62,66	62,66	62,60	62,65	16,9	44,99025
1A3	E	21,12	21,36	21,36	21,67	21,38		
	T	62,57	62,69	62,59	62,59	62,61	16,9	40,40699
								42,42463
1B1	E	27,89	27,92	27,92	27,56	27,82		
	T	63,03	63,11	63,21	63,22	63,14	18	39,31085
1B2	E	27,91	27,46	27,92	27,05	27,59		
	T	63,41	63,76	63,86	63,88	63,73	18	48,09541
1B3	E	26,35	26,35	26,21	26,22	26,28		
	T	61,53	61,53	61,54	61,69	61,57	18	47,42828
								44,94485
<i>2A E 2B</i>								
2A1	E	24,50	24,57	24,69	24,69	24,61		
	T	65,61	65,75	65,76	65,70	65,71	18,2	41,16384
2A2	E	25,51	25,44	25,97	25,99	25,73		
	T	63,53	63,57	63,58	63,50	63,55	18,2	44,49127
2A3	E	25,50	25,79	25,97	25,09	25,59		
	T	61,59	61,39	61,59	61,45	61,51	18,2	45,71682
								43,79065
2B1	E	27,56	27,12	27,12	26,52	27,08		
	T	64,87	64,91	64,80	64,81	64,85	17,6	47,45399
2B2	E	27,62	27,65	26,96	26,65	27,22		
	T	64,82	64,44	64,42	64,73	64,60	17,6	47,88022
2B3	E	30,72	30,72	30,71	30,61	30,69		
	T	63,85	63,76	63,58	63,63	63,71	17,6	54,74453
								50,02625
<i>3A E 3B</i>								
3A1	E	18,40	18,41	18,37	18,36	18,39		
	T	65,15	65,03	65,05	65,04	65,07	13,3	42,48913
3A2	E	16,28	16,28	16,43	16,52	16,38		
	T	64,21	64,37	64,66	64,83	64,52	13,3	38,17231
3A3	E	22,55	22,00	21,98	21,72	22,06		
	T	64,71	64,57	64,55	64,56	64,60	13,3	51,3591
								44,00685
3B1	E	14,93	14,30	14,76	14,08	14,52		
	T	62,91	62,92	62,98	63,36	63,04	13,7	33,61769
3B2	E	11,46	11,59	11,10	11,27	11,36		
	T	64,13	64,07	64,07	64,01	64,07	13,7	25,87271
3B3	E	26,32	26,11	26,77	26,76	26,49		
	T	63,57	63,57	63,76	63,92	63,71	13,7	60,70408
								40,06482
<i>4A E 4B</i>								
4A1	E	25,84	25,80	25,96	25,31	25,73		

	T	64,01	64,15	64,32	64,41	64,22	12,3	65,13813
4A2	E	24,31	27,85	27,88	27,35	26,85		
	T	64,33	64,33	64,78	64,71	64,54	12,3	67,64202
4A3	E	27,42	27,08	27,99	27,99	27,62		
	T	61,42	61,56	61,76	61,42	61,54	12,3	72,97785
								68,586
4B1	E	30,70	30,76	30,89	30,22	30,64		
	T	65,54	65,81	66,03	66,20	65,90	12	77,50335
4B2	E	31,67	31,67	30,77	31,01	31,28		
	T	63,56	63,80	63,98	63,31	63,66	12	81,89018
4B3	E	24,93	23,91	23,92	23,69	24,11		
	T	62,13	62,13	61,97	62,21	62,11	12	64,70375
								74,69909
5A E 5B								
5A1	E	21,18	21,17	14,43	14,73	17,88		
	T	61,67	61,76	61,22	62,47	61,78	14,5	27,93668
5A2	E	23,69	21,91	20,66	21,39	21,91		
	T	64,39	64,43	64,66	64,66	64,54	14,5	34,85679
5A3	E	18,69	15,33	15,33	15,85	16,30		
	T	58,75	58,85	58,86	59,16	58,91	14,5	26,19091
								29,66146
5B1	E	26,55	26,80	26,55	24,41	26,08		
	T	62,96	63,19	63,46	63,55	63,29	13,6	47,82342
5B2	E	16,39	15,82	15,76	13,24	15,30		
	T	60,57	60,57	60,34	60,80	60,57	13,6	24,38366
5B3	E	13,83	13,52	13,88	15,75	14,25		
	T	60,78	60,92	60,82	60,78	60,83	13,6	21,67115
								31,29274
6A E 6B								
6A1	E	28,67	28,68	28,47	28,54	28,59		
	T	61,36	61,31	61,30	61,25	61,31	17,5	43,37418
6A2	E	30,58	30,64	30,55	30,46	30,56		
	T	60,87	60,84	60,93	61,05	60,92	17,5	47,39968
6A3	E	24,78	19,92	19,73	19,37	20,95		
	T	60,02	60,02	60,15	60,41	60,15	17,5	29,88152
								40,21846
6B1	E	31,28	31,11	31,13	31,06	31,15		
	T	62,26	62,41	62,44	62,42	62,38	17,9	46,08111
6B2	E	25,74	21,55	22,05	24,48	23,46		
	T	61,57	61,57	61,20	61,59	61,48	17,9	32,92268
6B3	E	24,77	24,75	24,09	24,15	24,44		
	T	60,57	60,58	61,06	61,24	60,86	17,9	35,16516
								38,05632
7A E 7B								
7A1	E	29,38	29,39	29,25	28,83	29,21		

	T	61,67	61,68	61,44	61,48	61,57	15,5	50,01891
7A2	E	21,42	26,89	26,82	27,58	25,68		
	T	64,19	64,21	64,22	64,13	64,19	15,5	40,41371
7A3	E	21,79	21,79	19,30	19,70	20,65		
	T	63,46	63,70	63,84	63,42	63,61	15,5	30,67726
								40,36996
7B1	E	25,30	25,66	25,72	25,79	25,62		
	T	61,31	60,96	61,59	61,97	61,46	15,4	42,85716
7B2	E	25,65	25,33	25,33	25,90	25,55		
	T	61,38	61,64	61,76	61,45	61,56	15,4	42,63208
7B3	E	26,08	26,03	26,73	26,73	26,39		
	T	62,19	62,52	62,08	62,06	62,21	15,4	43,81803
								43,10242
8A E 8B								
8A1	E	15,49	26,09	15,05	15,39	18,01		
	T	59,66	59,86	60,02	59,68	59,81	15,2	28,18804
8A2	E	32,32	31,87	32,01	32,07	32,07		
	T	63,82	63,90	64,06	64,17	63,99	15,2	54,51578
8A3	E	11,74	9,40	9,36	10,13	10,16		
	T	58,83	59,11	59,18	59,18	59,08	15,2	11,19865
								31,30082
8B1	E	20,86	20,87	20,85	20,71	20,82		
	T	59,93	59,97	60,17	60,43	60,13	14,8	35,06026
8B2	E	19,56	19,94	19,15	19,22	19,47		
	T	61,69	61,95	61,52	61,54	61,68	14,8	30,92079
8B3	E	25,96	21,60	21,13	21,37	22,51		
	T	63,62	63,65	63,79	63,89	63,74	14,8	36,00124
								33,9941

Quadro 3. AE OA LEB-52

1A E 1B							
	leitura 1	leitura 2	leitura 3	<i>Média</i>	<i>E24</i>	lipídio (mg)	<i>UE/mg lip</i>
1A1	2,549	2,551	2,537	2,545667	1,3917	11,69	3,968254
1A2	2,32	2,321	2,319	2,32	1,1660	11,69	3,324779
1A3	2,26	2,258	2,261	2,259667	1,1057	11,69	3,152742
							3,481925
1B1	2,557	2,556	2,555	2,556	1,4020	10,7	4,367601
1B2	2,507	2,492	2,498	2,499	1,3450	10,7	4,190031
1B3	2,319	2,32	2,321	2,32	1,1660	10,7	3,632399
							4,063344
2A E 2B							
	leitura 1	leitura 2	leitura 3	<i>Média</i>	<i>E24</i>	lip (mg)	<i>AE/mg lip</i>
2A1	2,31	2,304	2,309	2,307667	1,1537	14,1	2,727344
2A2	2,102	2,097	2,105	2,101333	0,9473	14,1	2,239559
2A3	2,091	2,103	2,083	2,092333	0,9383	14,1	2,218282
							2,395062

2B1	2,317	2,307	2,306	2,31	1,1560	13,5	2,854321
2B2	2,27	2,262	2,268	2,266667	1,1127	13,5	2,747325
2B3	2,414	2,409	2,42	2,414333	1,2603	13,5	3,111934
							2,904527
3A E 3B							
	leitura 1	leitura 2	leitura 3	<i>Média</i>	<i>E24</i>	lip (mg)	<i>AE/mg lip</i>
3A1	2,359	2,347	2,323	2,343	1,1890	10,8	3,669753
3A2	2,156	2,16	2,161	2,159	1,0050	10,8	3,101852
3A3	2,211	2,207	2,205	2,207667	1,0537	10,8	3,252058
							3,341221
3B1	2,383	2,388	2,395	2,388667	1,2347	10,3	3,995685
3B2	2,347	2,324	2,33	2,333667	1,1797	10,3	3,817691
3B3	2,304	2,317	2,303	2,308	1,1540	10,3	3,734628
							3,849335
4A E 4B							
	leitura 1	leitura 2	leitura 3	<i>Média</i>	<i>E24</i>	lip (mg)	<i>AE/mg lip</i>
4A1	2,017	2,01	2,009	2,012	0,8580	10,9	2,623853
4A2	2,122	2,128	2,137	2,129	0,9750	10,9	2,981651
4A3	2,047	2,044	2,031	2,040667	0,8867	10,9	2,711519
							2,772341
4B1	1,973	1,98	1,962	1,971667	0,8177	10,2	2,672113
4B2	2,206	2,203	2,202	2,203667	1,0497	10,2	3,430283
4B3	1,958	1,955	1,954	1,955667	0,8017	10,2	2,619826
							2,907407
5A E 5B							
5A1	1,55	1,552	1,553	1,551667	0,3977	12,0	1,10463
5A2	2,049	2,037	2,016	2,034	0,8800	12,0	2,444444
5A3	1,932	1,934	1,925	1,930333	0,7763	12,0	2,156481
							1,901852
5B1	1,917	1,912	1,893	1,907333	0,7533	12,6	1,992945
5B2	1,858	1,847	1,842	1,849	0,6950	12,6	1,838624
5B3	1,746	1,745	1,744	1,745	0,5910	12,6	1,563492
							1,798354
6A E 6B							
6A1	1,818	1,819	1,818	1,818333	0,6643	12,5	1,771556
6A2	1,713	1,711	1,706	1,71	0,5560	12,5	1,482667
6A3	1,635	1,632	1,631	1,632667	0,4787	12,5	1,276444
							1,510222
6B1	1,559	1,556	1,55	1,555	0,4010	13,5	0,990123
6B2	1,957	1,961	1,971	1,963	0,8090	13,5	1,997531
6B3	2,159	2,157	2,153	2,156333	1,0023	13,5	2,474897
							1,82085
7A E 7B							
7A1	1,961	1,957	1,949	1,955667	0,8017	7,5	3,562963
7A2	2,216	2,226	2,221	2,221	1,0670	7,5	4,742222
7A3	2,274	2,266	2,272	2,270667	1,1167	7,5	4,962963

							4,422716
7B1	2,3	2,299	2,302	2,300333	1,1463	6,8	5,619281
7B2	2,434	2,439	2,436	2,436333	1,2823	6,8	6,285948
7B3	2,061	2,059	2,058	2,059333	0,9053	6,8	4,437908
							5,447712
8A E 8B							
8A1	2,49	2,493	2,494	2,492333	1,3383	10,1	4,416942
8A2	2,219	2,217	2,214	2,216667	1,0627	10,1	3,507151
8A3	2,454	2,46	2,459	2,457667	1,3037	10,1	4,30253
							4,075541
8B1	2,331	2,326	2,329	2,328667	1,1747	10,3	3,80151
8B2	2,463	2,461	2,46	2,461333	1,3073	10,3	4,230852
8B3	2,497	2,505	2,495	2,499	1,3450	10,3	4,352751
							4,128371
9A E 9B							
9A1	2,655	2,657	2,66	2,657333	1,5033	20,6	2,432578
9A2	2,721	2,728	2,727	2,725333	1,5713	20,6	2,542611
9A3	2,685	2,696	2,684	2,688333	1,5343	20,6	2,48274
							2,485976
9B1	2,652	2,649	2,65	2,650333	1,4963	19,8	2,51908
9B2	2,604	2,6	2,608	2,604	1,4500	19,8	2,441077
9B3	2,615	2,614	2,611	2,613333	1,4593	19,8	2,45679
							2,472316
10A E 10B							
10A1	2,519	2,525	2,523	2,522333	1,3683	21,1	2,161664
10A2	2,532	2,529	2,525	2,528667	1,3747	21,1	2,171669
10A3	2,406	2,439	2,438	2,427667	1,2737	21,1	2,012112
							2,115148
10B1	2,968	2,957	2,96	2,961667	1,8077	20,6	2,925027
10B2	2,438	2,426	2,431	2,431667	1,2777	20,6	2,067422
10B3	2,462	2,462	2,463	2,462333	1,3083	20,6	2,117044
							2,369831
11A E 11B							
11A1	2,503	2,505	2,501	2,503	1,3490	20,0	2,248333
11A2	2,187	2,188	2,182	2,185667	1,0317	20,0	1,719444
11A3	2,518	2,53	2,528	2,525333	1,3713	20,0	2,285556
							2,084444
11B1	2,46	2,459	2,468	2,462333	1,3083	21,4	2,037902
11B2	2,456	2,451	2,453	2,453333	1,2993	21,4	2,023884
11B3	2,478	2,491	2,499	2,489333	1,3353	21,4	2,079958
							2,047248

Quadro 4. AE AO LEB-52

1A E 1B								
		Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Leitura 4	média	mg _{lipídio}	UE/ _{mglipídio}
1A1	E	17,71	17,48	7,07	7,68	12,49		

	T	61,70	61,69	62,04	62,16	61,90	20,17044	62,83627
1A2	E	18,51	18,55	16,50	16,97	17,63		
	T	58,73	58,89	58,90	58,83	58,84	29,96813	93,35867
1A3	E	18,37	9,22	9,40	18,37	13,84		
	T	63,49	63,38	63,67	63,38	63,48	21,80214	67,91945
								69,94654
1B1	E	17,71	17,48	7,07	7,68	12,49		
	T	61,70	61,69	62,04	62,16	61,90	20,17044	62,83627
1B2	E	18,51	18,55	16,50	16,97	17,63		
	T	58,73	58,89	58,90	58,83	58,84	29,96813	93,35867
1B3	E	18,37	9,22	9,40	18,37	13,84		
	T	63,49	63,38	63,67	63,38	63,48	21,80214	67,91945
								74,7048
1A E 1B								
2A1	E	8,44	8,04	8,24	8,37	8,27		
	T	61,35	61,57	61,82	61,50	61,56	14,1	31,76858
2A2	E	6,87	6,87	5,66	6,86	6,57		
	T	63,38	62,27	62,77	62,89	62,83	14,1	24,70271
2A3	E	22,63	22,77	22,87	22,86	22,78		
	T	61,47	61,46	61,52	61,53	61,50	14,1	87,58328
								48,01819
2B1	E	18,06	17,45	17,06	17,06	17,41		
	T	64,64	64,66	64,85	64,66	64,70	13,5	66,4294
2B2	E	26,38	15,42	15,89	15,99	18,42		
	T	64,64	64,58	64,58	64,59	64,60	13,5	70,40749
2B3	E	8,11	8,11	8,44	7,88	8,14		
	T	64,51	64,63	64,63	64,69	64,62	13,5	31,08631
								55,9744
3A E 3B								
3A1	E	25,93	25,23	25,88	25,05	25,52		
	T	63,93	63,95	64,14	63,75	63,94	10,8	123,1937
3A2	E	29,38	29,05	29,18	29,90	29,38		
	T	64,26	64,55	64,05	64,45	64,33	10,8	140,9526
3A3	E	25,77	21,77	21,77	18,45	21,94		
	T	63,34	62,64	62,79	62,65	62,86	10,8	107,7338
								123,96
3B1	E	31,32	20,24	20,09	20,01	22,92		
	T	64,46	65,45	65,45	65,13	65,12	10,3	113,8755
3B2	E	28,75	28,75	28,83	28,40	28,68		
	T	64,24	64,47	64,00	63,75	64,12	10,3	144,7768
3B3	E	27,91	27,91	28,10	28,11	28,01		
	T	62,51	63,22	63,41	63,41	63,14	10,3	143,5584
								134,0702
4A E 4B								
4A1	E	25,36	17,61	18,27	25,42	21,67		

	T	61,10	61,24	61,35	61,62	61,33	10,9	108,0328
4A2	E	7,18	6,83	6,53	6,72	6,82		
	T	61,01	61,19	61,38	61,26	61,21	10,9	34,04832
4A3	E	25,02	24,24	19,05	6,58	18,72		
	T	60,98	61,11	61,18	61,17	61,11	10,9	93,69228
								78,59114
4B1	E	4,21	4,22	4,26	3,78	4,12		
	T	63,84	63,97	63,54	64,01	63,84	10,2	21,07751
4B2	E	23,31	21,90	23,07	21,82	22,53		
	T	60,48	60,47	60,56	60,45	60,49	10,2	121,6914
4B3	E	15,62	15,65	27,51	27,52	21,58		
	T	61,84	61,87	61,99	61,99	61,92	10,2	113,8625
								85,54381
5A E 5B								
5A1	E	11,42	10,79	11,10	11,32	11,16		
	T	65,50	64,08	64,45	65,05	64,77	12,0	47,85094
5A2	E	25,90	9,27	9,27	25,90	17,59		
	T	65,81	66,04	66,20	66,20	66,06	12,0	73,94092
5A3	E	7,34	7,50	7,55	7,69	7,52		
	T	63,54	63,58	63,37	64,02	63,63	12,0	32,82997
								51,54061
5B1	E	12,53	12,53	11,99	11,54	12,15		
	T	65,12	65,12	65,20	65,20	65,16	12,6	49,31897
5B2	E	19,24	12,78	12,84	12,39	14,31		
	T	58,53	58,68	58,73	59,00	58,74	12,6	64,46541
5B3	E	6,18	6,32	6,41	6,45	6,34		
	T	63,28	63,28	63,59	63,89	63,51	12,6	26,40921
								46,7312
6A E 6B								
6A1	E	26,13	25,86	25,86	26,32	26,04		
	T	62,86	63,19	63,19	63,58	63,21	12,5	109,8753
6A2	E	23,05	23,83	23,63	23,85	23,59		
	T	62,43	62,55	62,88	62,08	62,49	12,5	100,6748
6A3	E	3,83	3,60	3,73	3,47	3,66		
	T	61,35	61,51	61,51	61,58	61,49	12,5	15,8623
								75,4708
6B1	E	23,45	3,95	4,29	7,35	9,76		
	T	66,54	66,55	63,54	63,52	65,04	13,5	37,05365
6B2	E	26,86	26,43	27,07	27,08	26,86		
	T	64,30	64,53	64,87	65,58	64,82	13,5	102,3156
6B3	E	25,64	25,97	10,46	10,81	18,22		
	T	63,28	62,80	63,04		63,38	13,5	70,98084
								70,1167
7A E 7B								
7A1	E	28,26	28,30	28,50	28,52	28,40		

	T	63,17	63,15	63,15	63,64	63,28	7,5	199,439
7A2	E	26,10	26,31	26,06	26,08	26,14		
	T	61,23	61,65	61,43	61,56	61,47	7,5	188,9888
7A3	E	26,44	26,61	26,01	26,00	26,27		
	T	60,91	61,29	61,40	61,28	61,22	7,5	190,6784
								193,0354
7B1	E	26,21	17,47	18,57	20,71	20,74		
	T	62,39	62,46	62,49	62,49	62,46	6,8	162,7774
7B2	E	26,44	26,45	26,45	26,13	26,37		
	T	60,24	60,30	60,47	60,47	60,37	6,8	214,1005
7B3	E	28,11	17,78	20,18	21,25	21,83		
	T	62,96	62,64	62,66	62,66	62,73	6,8	170,5879
								182,4886
8A E 8B								
8A1	E	7,01	7,01	7,12	7,28	7,11		
	T	59,24	59,48	59,80	59,64	59,54	10,1	39,38335
8A2	E	4,86	4,86	4,97	5,03	4,93		
	T	60,31	60,76	61,09	61,09	60,81	10,1	26,7554
8A3	E	6,81	6,81	7,06	6,51	6,80		
	T	59,30	59,60	59,32	59,32	59,39	10,1	37,77721
								34,63865
8B1	E	7,97	7,98	8,11	8,11	8,04		
	T	61,56	61,75	61,34	61,34	61,50	10,3	42,32287
8B2	E	6,98	6,66	6,55	6,89	6,77		
	T	60,43	59,76	60,16	60,27	60,16	10,3	36,42155
8B3	E	8,29	8,46	8,24	8,23	8,31		
	T	61,33	61,32	61,52	61,57	61,44	10,3	43,74871
								40,83105
9A E 9B								
9A1	E	29,61	29,67	29,66	29,67	29,65		
	T	60,69	60,71	60,89	61,03	60,83	20,6	78,87784
9A2	E	30,95	30,95	31,27	31,36	31,13		
	T	61,74	61,75	61,93	61,23	61,66	20,6	81,69668
9A3	E	30,76	31,14	31,17	31,18	31,06		
	T	64,15	64,42	64,17	64,51	64,31	20,6	78,15424
								79,57625
9B1	E	29,61	29,67	29,66	29,67	29,65		
	T	60,69	60,71	60,89	61,03	60,83	19,8	82,06483
9B2	E	30,95	30,95	31,27	31,36	31,13		
	T	61,74	61,75	61,93	61,23	61,66	19,8	84,99755
9B3	E	30,76	31,14	31,17	31,18	31,06		
	T	64,15	64,42	64,17	64,51	64,31	19,8	81,31199
								82,79146
10A E 10B								
10A1	E	6,24	6,37	6,37	6,51	6,37		

	T	63,07	63,47	63,65	63,73	63,48	21,1	15,85876
10A2	E	15,75	15,81	16,00	16,04	15,90		
	T	62,34	62,66	62,94	62,63	62,64	21,1	40,09815
10A3	E	39,15	29,43	29,74	30,14	32,12		
	T	61,36	61,67	61,91	61,91	61,71	21,1	82,21122
								46,05604
10B1	E	27,78	26,26	26,24	26,44	26,68		
	T	62,26	61,84	62,21	62,00	62,08	20,6	69,54455
10B2	E	25,67	25,74	26,06	26,06	25,88		
	T	60,70	60,88	60,88	61,20	60,92	20,6	68,75329
10B3	E	5,84	5,88	5,56	5,52	5,70		
	T	63,18	63,18	63,23	63,33	63,23	20,6	14,58691
								50,96158
11A E 11B								
11A1	E	27,99	28,30	28,12	28,12	28,13		
	T	61,36	61,75	62,03	62,36	61,88	20,0	75,77778
11A2	E	24,99	10,19	9,26	9,36	13,45		
	T	61,95	61,91	61,28	61,29	61,61	20,0	36,38626
11A3	E	27,42	27,20	26,67	27,71	27,25		
	T	59,74	59,92	59,98	60,42	60,02	20,0	75,67553
								62,61319
11B1	E	26,40	18,90	19,06	19,08	20,86		
	T	60,79	61,18	61,05	61,05	61,02	21,4	53,25064
11B2	E	28,39	28,12	28,20	27,72	28,11		
	T	63,87	64,08	64,23	64,06	64,06	21,4	68,34398
11B3	E	26,50	26,49	25,79	25,84	26,16		
	T	60,35	60,67	60,93	61,14	60,77	21,4	67,03669
								62,87711

Quadro 5. AE OA Paracas (PFC 2³) 1 mL

	leitura 1	leitura 2	leitura 2	Média	mg lip	UE/mg lipídio
1A1	0,464	0,433	0,43	0,442333	16,5	0,1273
1A2	0,666	0,62	0,623	0,636333	16,5	0,3857
1A3	0,469	0,494	0,5	0,487667	16,5	0,1547
						0,2226
1B1	0,917	0,87	0,877	0,888	22,1	0,2967
1B2	0,835	0,791	0,716	0,780667	22,1	0,2481
1B3	0,523	0,533	0,531	0,529	22,1	0,1342
						0,2263
2A1	0,801	0,776	0,77	0,782333	19,8	0,2778
2A2	0,452	0,466	0,459	0,459	19,8	0,1145
2A3	0,568	0,561	0,538	0,555667	19,8	0,1633
						0,1852
2B1	0,927	0,94	0,935	0,934	24	0,2924
2B2	1,187	1,184	1,156	1,175667	24	0,3931
2B3	1,337	1,314	1,31	1,320333	24	0,4533

						0,3796
3A1	1,454	1,452	1,444	1,45	26,1	0,4665
3A2	1,939	1,934	1,936	1,936333	26,1	0,6529
3A3	1,237	1,227	1,225	1,229667	26,1	0,3821
						0,5005
3B1	0,86	0,822	0,818	0,833333	26	0,2312
3B2	1,059	1,05	1,044	1,051	26	0,3149
3B3	1,905	1,895	1,885	1,895	26	0,6395
						0,3952
4A1	1,782	1,783	1,786	1,783667	21,2	0,7318
4A2	0,689	0,649	0,632	0,656667	21,2	0,2002
4A3	2,44	2,421	2,427	2,429333	21,2	1,0363
						0,6561
4B1	1,331	1,291	1,29	1,304	21,2	0,5055
4B2	1,73	1,724	1,704	1,719333	21,2	0,7014
4B3	2,712	2,71	2,712	2,711333	21,2	1,1693
						0,7921
5A1	1,984	1,974	1,971	1,976333	22,4	0,7786
5A2	1,428	1,391	1,349	1,389333	22,4	0,5165
5A3	0,81	0,777	0,774	0,787	22,4	0,2476
						0,5142
5B1	0,955	0,932	0,956	0,947667	19,9	0,3595
5B2	1,233	1,186	1,179	1,199333	19,9	0,4859
5B3	1,789	1,784	1,783	1,785333	19,9	0,7804
						0,5419
6A1	1,521	1,501	1,494	1,505333	25,4	0,5012
6A2	0,839	0,816	0,81	0,821667	25,4	0,2320
6A3	0,862	0,824	0,771	0,819	25,4	0,2310
						0,3214
6B1	1,857	1,844	1,836	1,845667	25,4	0,6352
6B2	1,609	1,596	1,592	1,599	25,4	0,5381
6B3	1,305	1,364	1,363	1,344	25,4	0,4377
						0,5370
7A1	1,654	1,632	1,626	1,637333	29,2	0,4812
7A2	1,848	1,831	1,83	1,836333	29,2	0,5493
7A3	1,717	1,706	1,71	1,711	29,2	0,5064
						0,5123
7B1	1,845	1,847	1,845	1,845667	28,2	0,5721
7B2	1,859	1,847	1,818	1,841333	28,2	0,5706
7B3	1,766	1,741	1,743	1,75	28,2	0,5382
						0,5603
8A1	2,027	2,029	2,009	2,021667	28,6	0,6256
8A2	1,753	1,751	1,75	1,751333	28,6	0,5311
8A3	1,836	1,846	1,83	1,837333	28,6	0,5612
						0,5726
8B1	2,407	2,393	2,398	2,399333	26,1	0,8303

8B2	3,016	3,015	3,014	3,015	26,1	1,0662
8B3	1,946	1,939	1,938	1,941	26,1	0,6547
						0,8504
9A1	2,268	2,273	2,264	2,268333	14,4	1,4139
9A2	2,336	2,361	2,338	2,345	14,4	1,4671
9A3	2,652	2,66	2,657	2,656333	14,4	1,6833
						1,5215
9B1	1,886	1,889	1,882	1,885667	14,5	1,1402
9B2	1,758	1,757	1,755	1,756667	14,5	1,0513
9B3	1,932	1,934	1,932	1,932667	14,5	1,1726
						1,1214
10A1	1,929	1,91	1,915	1,918	1,6857	1,0737
10A2	1,822	1,817	1,803	1,814	1,5817	1,0074
10A3	1,621	1,62	1,627	1,622667	1,3903	0,8856
	1,929	1,91	1,915	1,918	1,6857	0,9889
10B1	2,269	2,683	2,691	2,547667	16	1,4471
10B2	2,238	2,236	2,227	2,233667	16	1,2508
10B3	2,241	2,416	2,418	2,358333	16	1,3288
						1,3422
11A1	1,454	1,453	1,449	1,452	14,1	0,8650
11A2	2,031	2,03	2,032	2,031	14,1	1,2757
11A3	1,908	1,905	1,905	1,906	14,1	1,1870
						1,1092
11B1	1,883	1,878	1,868	1,876333	11,4	1,4421
11B2	2,132	2,131	2,127	2,13	11,4	1,6646
11B3	2,078	2,073	2,083	2,078	11,4	1,6190
						1,5752

Quadro 6. AE AO Paracas (PFC 2^o) 1 mL

		Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Leitura 4	média	mg _{lipídio}	UE/ _{mglipídio}
1A1	E	32,46	32,21	32,53	32,85	32,51		
T		62,90	63,28	63,29	63,09	63,14	16,50	27,33
1A2	E	32,75	32,51	32,38	32,38	32,51		
T		62,19	62,32	62,32	61,72	62,14	16,50	27,83
1A3	E	31,35	31,45	31,17	31,17	31,29		
T		61,44	61,45	61,37	61,26	61,38	16,50	27,01
								27,39
1B1	E	36,92	36,82	36,69	36,69	36,78		
T		64,56	64,73	65,01	65,04	64,84	18,90	26,63
1B2	E	36,55	36,67	36,83	36,03	36,52		
T		62,21	32,38	62,33	62,91	54,96	18,90	31,77
1B3	E	35,96	35,88	35,14	36,18	35,79		
T		63,05	63,55	63,48	63,73	63,45	18,90	26,46
								28,29
2A1	E	32,82	32,84	33,04	32,68	32,85		
T		62,00	61,79	62,20	62,31	62,08	19,80	23,49

2A2	E	30,76	30,76	30,74	31,07	30,83		
T		60,92	60,52	61,00	61,40	60,96	19,80	22,31
2A3	E	30,76	31,01	31,22	31,22	31,05		
T		61,71	61,68	61,67	61,90	61,74	19,80	22,17
								22,66
2B1	E	36,48	36,48	36,54	36,55	36,51		
T		65,56	65,67	65,98	65,99	65,80	24,00	20,45
2B2	E	32,76	33,01	33,05	33,39	33,05		
T		62,39	62,39	62,16	62,18	62,28	24,00	19,45
2B3	E	34,28	34,54	34,55	34,71	34,52		
T		64,13	64,25	64,24	64,24	64,22	24,00	19,73
								19,88
3A1	E	34,71	34,98	35,06	34,98	34,93		
T		63,39	63,50	63,50	63,47	63,47	26,10	18,64
3A2	E	33,58	33,53	33,40	33,28	33,45		
T		57,68	57,68	57,60	58,40	57,84	26,10	19,70
3A3	E	33,58	34,12	34,23	33,92	33,96		
T		59,20	58,21	59,25	59,65	59,08	26,10	19,57
								19,31
3B1	E	33,96	34,09	34,15	34,15	34,09		
T		34,14	64,59	64,95	65,06	57,19	26,00	20,47
3B2	E	33,68	33,61	33,62	33,35	33,57		
T		63,39	63,42	63,24	63,24	63,32	26,00	17,93
3B3	E	35,12	35,32	35,43	35,80	35,42		
T		62,62	63,02	63,51	63,30	63,11	26,00	19,12
								19,17
4A1	E	37,16	36,64	36,56	36,49	36,71		
T		35,16	64,49	64,37	63,83	56,96	21,20	27,38
4A2	E	33,05	33,14	32,72	33,30	33,05		
T		63,13	63,34	62,99	62,85	63,08	21,20	21,70
4A3	E	33,95	37,95	38,08	38,19	37,04		
T		65,42	65,85	65,77	65,71	65,69	21,20	23,58
								24,22
4B1	E	35,89	35,72	35,72	35,83	35,79		
T		64,49	64,82	64,70	64,90	64,73	21,20	23,06
4B2	E	36,82	37,10	36,94	36,93	36,95		
T		65,25	65,45	65,86	65,82	65,60	21,20	23,55
4B3	E	38,13	38,14	38,25	38,53	38,26		
T		64,40	64,80	64,36	64,56	64,53	21,20	24,95
								23,86
5A1	E	34,08	34,08	34,64	34,92	34,43		
T		62,55	62,84	63,15	63,64	63,05	22,40	21,52
5A2	E	32,76	33,00	33,25	33,40	33,10		
T		61,59	61,02	61,36	61,96	61,48	22,40	21,18
5A3	E	31,86	31,88	31,88	32,24	31,97		

T		61,36	61,67	61,08	61,59	61,43	22,40	20,38
								21,03
5B1	E	36,65	36,93	36,90	36,82	36,83		
T		65,08	65,61	66,01	66,17	65,72	19,90	24,94
5B2	E	33,49	34,00	34,15	33,79	33,86		
T		63,44	63,54	63,40	63,22	63,40	19,90	23,62
5B3	E	34,79	34,79	35,09	35,23	34,98		
T		64,82	65,27	63,98	64,78	64,71	19,90	23,94
								24,17
6A1	E	34,33	34,45	34,56	34,37	34,43		
T		61,95	62,26	62,47	62,39	62,27	25,4	19,25
6A2	E	35,57	35,62	35,76	35,55	35,63		
T		34,07	64,45	64,87	65,26	57,16	25,4	22,02
6A3	E	35,44	35,39	35,58	35,05	35,37		
T		64,45	64,81	64,92	64,90	64,77	25,400	18,98
								20,08
6B1	E	37,45	37,45	37,59	37,30	37,45		
T		65,49	65,71	65,73	65,93	65,72	25,4	19,92
6B2	E	37,14	37,16	36,98	37,08	37,09		
T		65,50	65,43	65,28	65,41	65,41	25,4	19,81
6B3	E	36,10	35,52	35,53	35,76	35,73		
T		65,20	65,01	65,24	65,21	65,17	25,400	19,07
								19,60
7A1	E	36,43	36,45	36,70	36,76	36,59		
T		63,62	63,95	64,12	64,12	63,95	29,2	17,40
7A2	E	36,14	35,84	35,97	36,06	36,00		
T		62,77	62,84	62,70	62,61	62,73	29,2	17,46
7A3	E	35,90	36,20	36,19	36,30	36,15		
T		63,55	63,18	63,59	63,90	63,56	29,200	17,29
								17,38
7B1	E	35,72	35,27	35,43	35,52	35,49		
T		63,61	63,65	63,72	63,72	63,68	28,2	17,49
7B2	E	36,85	35,70	36,00	35,01	35,89		
T		64,09	63,74	63,09	63,41	63,58	28,2	17,75
7B3	E	37,10	37,12	36,83	36,93	37,00		
T		65,39	65,42	65,32	65,27	65,35	28,200	17,81
								17,68
8A1	E	38,98	38,46	38,28	37,95	38,42		
T		66,66	66,51	66,29	66,01	66,37	28,6	18,00
8A2	E	35,25	37,73	37,86	38,00	37,21		
T		66,43	66,30	66,73	65,88	66,34	28,6	17,38
8A3	E	36,80	36,80	36,84	36,60	36,76		
T		64,10	63,59	63,66	63,96	63,83	28,600	17,90
								17,76
8B1	E	39,40	39,74	39,60	39,84	39,65		
T		64,42	64,82	65,23	65,59	65,02	26,1	20,91

8B2	E	39,36	39,32	39,33	39,73	39,44		
T		64,28	64,50	64,29	64,61	64,42	26,1	21,00
8B3	E	38,67	38,67	38,67	38,19	38,55		
T		65,43	65,53	64,97	64,14	65,02	26,100	20,27
								20,73
9A1	E	37,29	36,97	37,00	37,07	37,08		
T		60,70	60,24	60,30	61,31	60,64	14,40	38,02
9A2	E	37,33	37,46	37,65	37,95	37,60		
T		60,00	61,12	60,33	60,56	60,50	14,40	38,71
9A3	E	35,36	35,07	35,24	35,42	35,27		
T		58,47	58,48	58,28	58,26	58,37	14,40	37,52
								38,09
9B1	E	35,31	35,04	34,91	35,09	35,09		
T		58,23	58,80	59,05	59,21	58,82	14,50	36,73
9B2	E	33,29	33,60	33,69	33,99	33,64		
T		61,83	62,13	62,12	61,97	62,01	14,50	33,00
9B3	E	35,33	35,04	35,09	34,71	35,04		
T		60,61	60,54	60,87	61,13	60,79	14,50	35,34
								35,02
10A1	E	36,79	37,25	37,04	36,84	36,98		
T		64,04	64,28	64,34	64,23	64,22	15,70	32,60
10A2	E	36,46	36,88	36,48	36,63	36,61		
T		63,14	62,66	63,63	62,88	63,08	15,70	32,90
10A3	E	35,68	35,36	35,37	35,81	35,56		
T		63,10	62,80	63,05	63,51	63,12	15,70	31,81
								32,43
10B1	E	39,07	39,10	39,12	39,36	39,16		
T		62,06	62,36	62,27	62,94	62,41	16,00	35,22
10B2	E	37,01	36,98	37,05	36,40	36,86		
T		60,55	60,45	60,31	60,24	60,39	16,00	34,15
10B3	E	37,49	37,02	36,66	36,79	36,99		
T		60,25	60,60	61,10	61,34	60,82	16,00	34,01
								34,46
11A1	E	38,43	38,17	37,91	37,92	38,11		
T		61,86	61,64	61,47	61,69	61,67	8,60	64,42
11A2	E	37,90	38,03	37,82	37,90	37,91		
T		62,60	62,36	62,69	62,70	62,59	8,60	63,00
11A3	E	38,71	39,02	39,14	39,44	39,08		
T		61,84	61,84	62,20	61,91	61,95	8,60	65,91
								64,44
11B1	E	37,30	36,96	36,99	37,00	37,06		
T		62,01	62,42	62,85	62,37	62,41	11,40	46,48
11B2	E	38,35	37,98	38,02	37,92	38,07		
T		62,17	62,58	62,22	62,06	62,26	11,40	48,02
1B3	E	35,81	65,98	35,77	35,40	43,24		
T		59,62	59,35	59,24	59,13	59,34	11,40	58,31

5B1	2,481	2,483	2,482	2,482	1,3280	21,2	2,08805
5B2	2,487	2,486	2,486	2,486333	1,3323	21,2	2,094864
5B3	2,488	2,489	2,49	2,489	1,3350	21,2	2,099057
							2,09399
6A E 6B							
6A1	2,599	2,596	2,597	2,597333	1,4433	25,4	1,894138
6A2	2,594	2,596	2,597	2,595667	1,4417	25,4	1,891951
6A3	2,678	2,677	2,674	2,676333	1,5223	25,4	1,997813
							1,927967
6B1	2,608	2,609	2,611	2,609333	1,4553	25,4	1,909886
6B2	2,587	2,586	2,586	2,586333	1,4323	25,4	1,879703
6B3	2,663	2,672	2,672	2,669	1,5150	25,4	1,988189
							1,925926
7A E 7B							
7A1	2,597	2,598	2,599	2,598	1,4440	29,2	1,648402
7A2	2,712	2,713	2,714	2,713	1,5590	29,2	1,77968
7A3	2,605	2,606	2,606	2,605667	1,4517	29,2	1,657154
							1,695079
7B1	2,479	2,478	2,478	2,478333	1,3243	28,2	1,565406
7B2	2,481	2,479	2,479	2,479667	1,3257	28,2	1,566982
7B3	2,496	2,498	2,501	2,498333	1,3443	28,2	1,589046
							1,573811
8A E 8B							
8A1	2,625	2,632	2,631	2,629333	1,4753	28,6	1,719503
8A2	2,526	2,523	2,521	2,523333	1,3693	28,6	1,59596
8A3	2,572	2,576	2,575	2,574333	1,4203	28,6	1,6554
							1,656954
8B1	2,573	2,575	2,575	2,574333	1,4203	26,1	1,813963
8B2	2,593	2,595	2,594	2,594	1,4400	26,1	1,83908
8B3	2,512	2,517	2,515	2,514667	1,3607	26,1	1,737761
							1,796935
9A E 9B							
9A1	2,002	2,006	2,019	2,009	0,8550	14,4	1,979167
9A2	1,733	1,732	1,731	1,732	0,5780	14,4	1,337963
9A3	2,042	2,034	2,033	2,036333	0,8823	14,4	2,042438
							1,786523
9B1	2,066	2,065	2,066	2,065667	0,9117	14,5	2,095785
9B2	2,142	2,139	2,135	2,138667	0,9847	14,5	2,263602
9B3	2,142	2,137	2,136	2,138333	0,9843	14,5	2,262835
							2,207407
10A E 10B							
10A1	2,00	2,001	1,99	1,997	0,8430	16	1,75625
10A2	2,015	2,014	2,011	2,013333	0,8593	16	1,790278
10A3	2,365	2,365	2,367	2,365667	1,2117	16	2,524306
							2,023611
10B1	1,805	1,803	1,801	1,803	0,6490	15,7	1,377919

10B2	2,189	2,191	2,191	2,190333	1,0363	15,7	2,200283
10B3	1,947	1,951	1,949	1,949	0,7950	15,7	1,687898
							1,755367
11A E 11B							
11A1	1,707	1,788	1,797	1,764	0,6100	8,6	2,364341
11A2	1,836	1,85	1,857	1,847667	0,6937	8,6	2,68863
11A3	2,264	2,251	2,247	2,254	1,1000	8,6	4,263566
							3,105512
11B1	2,054	2,059	2,061	2,058	0,9040	11,4	2,643275
11B2	1,821	1,823	1,823	1,822333	0,6683	11,4	1,954191
11B3	2,101	2,103	2,104	2,102667	0,9487	11,4	2,773879
							2,457115

Quadro 8. AE AO Paracas (PFC 2³) - diluição 3,33 x

1A E 1B								
		Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Leitura 4	média	mg _{lipídio}	UE/ _{mslipídio}
1A1	E	27,97	26,74	27,28	27,47	27,37		
	T	64,95	65,11	65,36	65,36	65,20	22,1	54,54873
1A2	E	26,91	26,41	26,76	26,86	26,74		
	T	63,29	63,54	63,49	63,62	63,49	22,1	63,51781
1A3	E	28,34	28,32	28,32	28,54	28,38		
	T	65,19	65,51	64,80	64,76	65,07	22,1	65,78872
								61,28509
1B1	E	22,59	23,01	22,54	22,99	22,7825		
	T	59,6	59,86	59,49	59,2	59,5375	18,9	57,24432
1B2	E	23,86	23,97	24,05	23,74	23,905		
	T	62,15	61,84	61,82	61,83	61,91	18,9	57,85579
1B3	E	25,51	25,51	25,81	25,95	25,695		
	T	63,23	63,71	63,66	63,84	63,61	18,9	60,9988
								58,69964
2A E 2B								
2A1	E	27,69	27,69	27,36	27,15	27,47		
	T	63,93	63,97	63,81	63,76	63,87	19,8	62,63732
2A2	E	23,56	23,98	24,21	24,11	23,97		
	T	60,12	60,48	60,97	60,91	60,62	19,8	56,7759
2A3	E	26,68	26,68	26,84	26,44	26,66		
	T	63,08	63,44	63,41	63,40	63,33	19,8	61,08926
								60,16749
2B1	E	27,7	25,89	26,03	26,16	26,445		
	T	64,6	64,32	34,32	63,99	56,8075	19,1	71,1059
2B2	E	25,72	25,59	24,8	25,02	25,2825		
	T	62,84	63,04	62,83	63,26	62,9925	19,1	59,90831
2B3	E	24,84	24,98	25,17	25,73	25,18		
	T	61,9	61,91	61,6	61,89	61,825	19,1	60,94169
								63,9853
3A E 3B								

3A1	E	26,55	26,77	26,89	27,00	26,80		
	T	65,46	65,82	63,84	65,08	65,05	26,10	45,2039
3A2	E	26,55	26,77	26,89	27,00	26,80		
	T	62,97	62,97	62,80	62,79	62,88	26,10	47,01772
3A3	E	26,55	26,77	26,89	27,00	26,80		
	T	63,24	63,33	63,70	63,73	63,50	26,10	46,48837
								46,23666
3B1	E	24,24	24,36	23,94	24,1	24,16		
	T	60,62	60,7	61,24	61,03	60,8975	26,00	43,4166
3B2	E	26,14	26,69	27,29	27,46	26,895		
	T	62,68	62,4	62,15	62,42	62,4125	26,00	47,80008
3B3	E	26,14	26,69	27,29	27,46	26,895		
	T	62,42	62,56	62,71	62,03	62,43	26,00	47,78459
								46,33376
4A E 4B								
4A1	E	22,58	22,63	22,36	22,74	22,58		
	T	56,46	56,96	56,96	56,92	56,83	21,20	53,33862
4A2	E	21,44	21,58	21,83	21,83	21,67		
	T	54,92	55,09	54,75	54,92	54,92	21,20	52,90743
4A3	E	16,40	16,51	16,61	16,93	16,61		
	T	55,98	55,98	56,27	51,54	54,94	21,20	38,40863
								48,21822
4B1	E	22,24	22,89	23,4	23,45	22,995		
	T	55,31	55,67	55,67	52,6	54,8125	21,20	56,82994
4B2	E	22,68	22,74	22,64	22,73	22,6975		
	T	54,7	55,07	55,33	55,48	55,145	21,20	55,58396
4B3	E	17,9	17,91	18	18,21	18,005		
	T	54,67	54,79	54,87	54,97	54,825	21,20	42,50407
								51,63932
5A E 5B								
5A1	E	25,83	25,87	24,93	25,08	25,43		
	T	55,77	55,73	55,54	54,87	55,48	22,40	59,56194
5A2	E	24,36	24,67	23,67	23,30	24,00		
	T	54,01	54,15	54,15	54,17	54,12	22,40	57,34766
5A3	E	24,62	24,71	24,84	24,91	24,77		
	T	54,73	54,90	55,30	55,76	55,17	22,40	58,1656
								58,3584
5B1	E	20,22	20,67	20,75	20,86	20,625		
	T	52,51	52,71	52,74	52,74	52,675	19,90	55,8575
5B2	E	25,15	25,21	25,33	25,2	25,2225		
	T	55,85	55,86	55,85	55,85	55,8525	19,90	65,91433
5B3	E	23,53	23,85	23,89	24,24	23,8775		
	T	55,61	55,72	55,99	55	55,58	19,90	62,2317
								61,33451
6A E 6B								

6A1	E	22,35	22,40	22,40	22,48	22,41		
	T	54,24	54,24	51,25	55,03	53,69	25,4	47,14789
6A2	E	20,61	20,76	19,76	19,90	20,26		
	T	54,01	53,71	53,70	53,95	53,84	25,4	41,75243
6A3	E	20,84	20,97	21,28	21,29	21,10		
	T	54,87	54,98	54,17	54,05	54,52	25,4	43,15712
								44,01915
6B1	E	20,25	20,26	20,32	20	20,2075		
	T	52,47	52,64	52,53	52,93	52,6425	25,4	42,7533
6B2	E	23,55	23,75	23,76	25,85	24,2275		
	T	55,57	55,65	55,98	56	55,8	25,4	49,3572
6B3	E	23,44	23,71	23,71	23,93	23,6975		
	T	55,73	56,1	55,73	55,28	55,71	25,4	48,20076
								46,77042
7A E 7B								
7A1	E	24,28	24,73	24,73	24,76	24,63		
	T	63,67	63,62	63,88	63,80	63,74	29,2	37,47001
7A2	E	24,96	24,77	24,60	24,33	24,67		
	T	60,57	60,89	61,25	61,07	60,95	29,2	39,56923
7A3	E	26,86	27,07	27,07	26,86	26,97		
	T	64,20	63,89	63,98	64,17	64,06	29,2	41,42132
								39,48685
7B1	E	27,11	27,03	27,04	27,07	27,0625		
	T	62,72	62,71	62,88	62,89	62,8	28,2	44,07197
7B2	E	26,07	26,53	26,76	26,8	26,54		
	T	62,03	62,32	61,94	61,8	62,0225	28,2	43,71472
7B3	E	26,08	26,08	26,2	26,38	26,185		
	T	64,01	64,25	64,13	64,13	64,13	28,2	41,39817
								43,06162
8A E 8B								
8A1	E	28,62	28,79	28,79	28,59	28,70		
	T	66,61	66,76	66,92	66,91	66,80	28,6	43,30077
8A2	E	26,20	26,30	26,30	26,16	26,24		
	T	63,46	63,48	63,85	63,08	63,47	28,6	41,41693
8A3	E	24,23	24,31	24,24	24,30	24,27		
	T	62,71	63,10	63,00	63,01	62,96	28,6	38,16209
								40,95993
8B1	E	8,15	8,44	8,7	8,41	8,425		
	T	62,7	62,89	63,15	63,06	62,95	26,1	9,674799
8B2	E	28,25	27,9	27,99	28,06	28,05		
	T	63,77	64,05	64,3	64,7	64,205	26,1	48,37793
8B3	E	27,03	27,18	27,18	27,31	27,175		
	T	62,57	62,61	62,58	62,79	62,6375	26,1	47,99015
								35,34762
9A E 9B								

APÊNDICE E – EVOLUÇÃO DE CO₂

Quadro 1. Evolução de CO₂

<i>Dias</i>	<i>Controle</i>	<i>Atenuação Diesel</i>	<i>Atenuação Biodiesel</i>	<i>Biossurfactante Diesel</i>	<i>Biossurfactante Biodiesel</i>
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	2,92	6,95	8,42	11,5	14,88
4	4,44	10,31	17,23	58,39	75,7
5	6,29	13,77	21,44	83,69	108,28
7	7,96	17,59	26,93	121,62	153,85
8	9,9	23,22	33,58	147,22	186,74
11	14,27	39,61	47,53	215,66	273,46
13	16,01	45,57	54,77	242,47	309,42
15	17,11	49,03	59,12	272,26	349,98
18	20,14	66,84	82,29	338,22	435,73
20	22,38	74,43	90,27	369,39	481,84
22	23,97	80,1	96,24	392,27	521,63
25	25,97	84,57	103,62	414,91	565,57
27	26,63	86,07	105,16	432,41	596,8
29	28,63	89,52	109,01	447,89	623,38
31	31,49	97,89	121,35	484,43	687,01
33	33,88	103,95	128,44	504,98	724,43
35	35,63	110,12	139,02	526,67	764,38
38	38,87	121,21	153,67	565,74	847,7
40	40,96	130,06	164,47	591,37	898,85
42	42,38	134,94	171,63	610,09	943,69
45	43,35	143,69	183,02	641,01	1014,8
47	47,07	149,43	192,97	660,49	1059,48
49	48,76	157,42	202,99	680,75	1110,57
52	51,63	168,71	218,65	717,99	1191,55
54	53,15	173,72	226,16	735,57	1231,71
56	55,36	179,33	236,23	754,25	1275,72
60	56,69	184,52	246,81	775,3	1341,65

APÊNDICE F – DETERMINAÇÃO DE ÓLEOS E GRAXAS

Quadro 1. Óleos e graxas T₁ - 01/10/2012

<i>Ensaio</i>	<i>amostra</i>	<i>balão</i>	<i>Balão+OeG</i>	<i>% umidade</i>	<i>água (g)</i>	<i>Solo seco (g)</i>	<i>Teor residual</i>	<i>% biodegradação</i>	<i>Média/desv.</i>
2A	10,149	104,2009	104,3389	28,78	2,92	7,23	1,9093	52,27	51,979±0,40
2B	10,109	89,4032	89,5381	30,94	3,13	6,98	1,9324	51,69	
3A	10,320	91,7339	91,9329	27,42	2,83	7,49	2,6567	33,58	31,733±2,61
3B	10,227	99,3190	99,5260	27,83	2,85	7,38	2,8047	29,88	
4A	10,039	99,9730	100,0991	26,50	2,66	7,38	1,7090	62,02	62,81±1,12
4B	10,180	88,9008	89,0245	25,79	2,62	7,56	1,6373	63,62	
5A	10,029	89,2041	89,2913	26,36	2,64	7,39	1,1807	73,76	70,09±5,19
5B	10,064	100,7929	100,9056	25,89	2,61	7,46	1,5111	66,42	
7A	10,083	100,7600	100,8932	27,52	2,78	7,31	1,8227	54,43	60,77±8,97
7B	10,016	116,4258	116,5202	28,33	2,84	7,18	1,3151	67,12	
8A	10,187	94,3991	94,5853	28,30	2,88	7,30	2,5491	36,27	35,80±0,65
8B	10,028	101,4884	101,6775	27,09	2,72	7,31	2,5864	35,34	
9A	10,136	99,9408	100,0265	29,42	2,98	7,15	1,1979	73,38	73,87±0,70
9B	10,003	135,2457	135,3276	28,99	2,90	7,10	1,1530	74,38	
10A	10,073	143,1537	143,2627	24,47	2,47	7,61	1,4327	68,16	67,86±0,41
10B	10,022	102,9193	103,0299	24,38	2,44	7,58	1,4593	67,57	

Quadro 2. Óleos e graxas T₂ - 29/10/2012

<i>Ensaio</i>	<i>amostra</i>	<i>balão</i>		<i>% umidade</i>	<i>água (g)</i>	<i>Solo seco (g)</i>	<i>Teor residual</i>	<i>% biodegradação</i>	<i>Média/desv.</i>
2A	10,773	124,1401	124,3010	28,26	3,04	7,73	2,0819	47,95	47,77±0,25
2B	10,647	101,6578	101,8200	27,34	2,91	7,74	2,0965	47,59	
3A	10,286	101,9570	102,1880	25,19	2,59	7,70	3,0019	24,95	24,66±0,40
3B	10,337	107,1090	107,3433	25,06	2,59	7,75	3,0246	24,38	
4A	10,061	98,1523	98,2375	24,31	2,45	7,62	1,1188	75,14	78,08±4,17
4B	10,019	101,8869	101,9506	25,48	2,55	7,47	0,8532	81,04	
5A	10,851	102,3345	102,4036	25,20	2,73	8,12	0,8514	81,08	81,27±0,28
5B	10,100	106,4619	106,5283	21,12	2,13	7,97	0,8335	81,48	
7A	10,261	106,8201	106,9525	26,70	2,74	7,52	1,7603	55,99	60,96±7,02
7B	10,103	107,0606	107,1599	27,87	2,82	7,29	1,3627	65,93	
8A	10,595	88,3396	88,5421	26,13	2,77	7,83	2,5873	35,32	35,53±0,30
8B	10,250	99,1202	99,3171	25,26	2,59	7,66	2,5701	35,75	
9A	10,871	124,6286	124,6862	28,09	3,05	7,82	0,7368	83,63	85,39±2,50
9B	10,227	113,1680	113,2103	28,37	2,90	7,33	0,5774	87,17	
10A	10,330	126,4913	126,5538	24,98	2,58	7,75	0,8065	82,08	82,45±0,52
10B	10,764	102,8612	102,9245	23,92	2,57	8,19	0,7729	82,82	