



**Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências da Biointeração
Programa de Pós Graduação em Biotecnologia**

SUELI CARVALHO DOS SANTOS

**PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO POR *Enterobacter* sp. EM
CONDIÇÕES ASSOCIADAS À UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS
GERADOS PELA INDÚSTRIA PETROQUÍMICA**

Salvador-BA

2014

SUELI CARVALHO DOS SANTOS

**PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO POR *Enterobacter* sp. EM
CONDIÇÕES ASSOCIADAS À UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS
GERADOS PELA INDÚSTRIA PETROQUÍMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Alexandre Chinalia.

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida

**Salvador – BA
2014**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde do SIBI /UFBA

S 237 Santos, Sueli Carvalho

Produção de biopolímeros por *Enterobacter sp.* em condições associadas à utilização de resíduos gerados pela indústria petroquímica / Sueli Carvalho dos Santos. – Salvador, 2014.

103 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Alexandre Chinalia

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2014.

1. Biotecnologia. 2. Enterobacter. 3. Biopolímeros. I. Chinalia, Fábio Alexandre II. Almeida, Paulo Fernando de. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU –57.08

SUELI CARVALHO DOS SANTOS

**PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO POR *Enterobacter* sp. EM
CONDIÇÕES ASSOCIADAS À UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS
GERADOS PELA INDÚSTRIA PETROQUÍMICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 29 de setembro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Fábio Alexandre Chinalia – Orientador _____
Doutor em Environmental Microbiology pela University of Aberdeen,
U.ABERDEEN, Escócia
Universidade Federal da Bahia.

Josilene Borges Torres Lima Matos _____
Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil
Universidade Federal da Bahia.

Ivani de Souza Bott _____
Doutora em Departamento of Metals and Materials Engineering pela Sheffield City
Polytechnic, SHU, Inglaterra.
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por conceder a oportunidade de realizar um sonho, e a certeza da sua presença em todos os momentos da minha vida.

A minha mãe, por deixar comigo a certeza que quando confiamos em Deus e não desistimos conquistamos tudo o que desejamos, te amarei por toda a minha vida.

Aos meus irmãos, por estarem comigo em todos os momentos, verdadeiros companheiros e amigos, sem vocês não seria possível mais esta conquista, amo muito a todos.

Aos meus sobrinhos que são anjos de luz na minha vida, me fortalece apenas com um sorriso.

Ao meu esposo, pelo apoio e incentivo, presença constante em todos os momentos, amo muito você.

A minha amada tia Bebel, por todo amor e carinho.

Ao meu orientador Professor Doutor Fábio Chinalia, pelo apoio intelectual e profissional, e pela paciência e por ter acreditado neste trabalho.

Ao meu co-orientador Professor Doutor Paulo Fernando de Almeida, pela confiança incentivo e oportunidade, muitíssimo obrigada!

A Professora Doutora Josilene Lima por todos ensinamentos , apoio.

A minha amiga Roberta Magalhães, pela amizade paciência e companheirismo.

Aos companheiros do LABEM pela recepção acolhedora, por todos os amigos conquistados, e as contribuições necessárias para a realização desse trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão desta etapa da minha vida, meu eterno agradecimento.

A FAPESB pela concessão da bolsa.

SANTOS, Sueli Carvalho dos Santos. Produção de biopolímero por *Enterobacter* sp. em condições associadas à utilização de resíduos gerados pela indústria petroquímica. 100 f. il.2014. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

RESUMO

Recentemente tem aumentado muito o interesse em exopolissacarídeos (EPS) de origem microbiana. Esse composto é um constituinte comum de muitos produtos comerciais em diferentes setores industriais como alimento, petróleo e farmacêutico. O objetivo desse trabalho foi o de quantificar e otimizar a produção de EPS a partir de duas bactérias previamente identificadas como sendo *Enterobacter* sp., pertencente a coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Micro-organismos LABEM. Os isolados foram primeiramente identificados com a nomenclatura CCMICS 544 e CCMICS 549 para ambas as cepas. Testes de cultivo em glicerol identificaram a *Enterobacter* CCMICS 549 como sendo a mais produtiva entre as cepas testadas alcançando a produção de EPS de aproximadamente 4 g.L⁻¹ em 36 horas. Essa cepa foi submetida a testes genéticos (16S rRNA) e bioquímicos que a identificaram como sendo *Enterobacter amnigenus* grupo 2. Para otimizar a produção de EPS foi realizado planejamento experimental utilizando a Metodologia “Superfície de Resposta”. Os resultados mostraram que as condições ótimas de cultivo acontecem a 35°C, pH 7.0, agitação de 240 rpm e com 3% glicerol. Nessas condições a produção de EPS foi de 0.05 g.L⁻¹h⁻¹ alcançando um total de (5,012) g.L⁻¹ em 60 horas, e com produção em meio a base de água produzida com produção de 7,27g.L⁻¹. A viscosidade do EPS em solução foi de aproximadamente 160 cP mesmo nas condições de alta salinidade (5% NaCl), temperatura (80 °C) e baixa concentração (1%). O modelo de Ostwald-de-Waele (parâmetros k e n) indicaram um comportamento pseudoplástico em todas as concentrações testadas (0.1-2.0%, w/v), temperaturas (15-80 °C) e, principalmente, salinidade (1 a 5%). A consistência de index indica que o polímero possui propriedades reológicas promissoras para aplicação como fluido de perfuração. O tratamento térmico mostrou que o EPS perde grande parte de sua massa em temperaturas acima de 300°C, mas ainda retém 50% do seu peso total a 1000°C indicando a presença de constituintes minerais em concentrações significantes. A caracterização do EPS no infravermelho identificou semelhanças químicas significantes com a goma Xantana.

Palavras-chave: *Enterobacter* sp., água produzida, glicerina bruta, biopolímero.

SANTOS, Sueli Carvalho dos Production of Biopolymer by *Enterobacter* sp. in conditions associated with the use of waste generated by the petrochemical industry. 100f. il.2014. Thesis (MA) - Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2014.

ABSTRACT

The interest in microbial produced exopolysaccharides (EPS) has increased considerably in recent years. This compound is a common constituent of many commercial products in different industrial sectors; such as food, petroleum, and pharmaceuticals. The aim of this study was to quantify and optimize EPS production from two bacterial previously identified as *Enterobacter* sp., Belonging to a culture collection of the Laboratory of Biotechnology and Ecology of Microorganisms LABEM. The isolates were primarily identified with CCMICS 544 and 549 CCMICS nomenclature for both strains. Culturing tests on glycerol identified *Enterobacter* CCMICS 549 as more productive among the strains reaching an EPS production value of about 4 g.L⁻¹ within 36 hours. This strain was then submitted to biochemical and genetic characterization (16S rRNA), which identified such strain as *Enterobacter amnigenus* group 2. To optimize the production of EPS was performed using experimental design methodology "Response Surface". The results showed that the optimum condition was achieved at 35°C, pH 7.0, agitation of 240 rpm and 3% crude glycerol. In such conditions, EPS production was of 0.05 gL⁻¹h⁻¹ reaching a total of 5,012 g.L⁻¹ within 60 hours, with production of water-based medium produced using production 7,27g.L⁻¹. EPS viscosity was of about 160 cP even at high salinity (5% NaCl), temperature (80 °C) and low concentration (1%). The Ostwald-de-Waele model parameters (K and n) indicated a pseudoplastic behavior at all concentrations (0.1 to 2.0%, w/v) temperatures (15-80 °C) and especially saline (1 to 5%). The consistency index indicates that the polymer has rheological properties promising for use as a drilling fluid. Thermal treatment showed that most of mass loss occurs at 300°C, but the polymer retains about 50% of its total weight at 1000°C indicating the significant presence of mineral constituents. The characterization of EPS synthesized by *Enterobacter amnigenus* infrared identified significant chemical similarities with the xanthan gum.

Keywords: *Enterobacter* sp., produced water, crude glycerine, biopolymer.

LISTA DE ABREVIATURAS

BTEX - Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos

CCMICS - Coleção de Culturas de Micro-organismos do ICS

DO - Densidade Ótica

EPS - Exopolissacarídeos

EOR - Recuperação avançada de petróleo

FDA - *Food and Drug Administration*

LABEM - Laboratório de biotecnologia e ecologia de micro-organismos

MEOR - Recuperação melhorada de petróleo com micro-organismos

MME - Ministério de Minas e Energia

MRB - Modificadores da Resposta Biológica

PAH - Hidrocarbonetos poliaromáticos

RPM - Rotação por minuto

RSM - Metodologia Superfície de Resposta

TSA - *Trypticase Soy Ágar*

TSB- *Tryptone Soy a Broth*

UFC - Unidades formadoras de colônias

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | | |
|--------|----|---|----|
| Figura | 01 | Diagrama que representa a correlação entre as propriedades de polissacarídeos mais relevantes com as suas principais áreas de aplicação. | 22 |
| Figura | 02 | Estrutura química do EPS produzido por <i>Enterobacter amnigenus</i> . | 23 |
| Figura | 03 | Estrutura do EPS extraído de <i>Enterobacter cloacae</i> , com unidades repetidas de glicose e galactose. | 24 |
| Figura | 04 | Estrutura da goma xantana. | 24 |
| Figura | 05 | Fluxograma 1ª etapa de experimentos adotados para a seleção da cepa objeto de estudo para a produção de biopolímero. | 43 |
| Figura | 06 | Fluxograma 2ª etapa de experimentos adotados para a caracterização da produção do biopolímero. | 44 |
| Figura | 07 | Aspecto das colônias crescidas em meio TSA à 28°C± 2°C, por 24 horas. CCMICS 544(A), CCMICS 549 (B) | 56 |
| Figura | 08 | Microplacas combo painel negativo para a análise de provas bioquímicas. | 58 |
| Figura | 09 | Curva de crescimento bacteriano da CCMICS 544. | 61 |
| Figura | 10 | Curva de crescimento bacteriano da CCMICS 549. | 61 |
| Figura | 11 | Análise filogenética da cepa CCMIS549. A árvore filogenética foi construída usando neighbour-Joining e Kimura 2-parametros com bootstraps de 100 repetições em evidencia na árvore. | 64 |
| Figura | 12 | Comportamento do crescimento da <i>Enterobacter amnigenus</i> . | 65 |
| Figura | 13 | LN do crescimento da <i>Enterobacter amnigenus</i> . | 65 |
| Figura | 14 | Cinética de produção de biopolímeros por <i>Enterobacter amnigenus</i> . | 66 |
| Figura | 15 | Gráfico da produção de biopolímero em diferentes concentrações de glicerol. | 68 |
| Figura | 16 | Comportamento produção de EPS em relação a temperatura e pH. | 73 |

| | | | |
|--------|----|--|----|
| Figura | 17 | Comportamento da produção de EPS em relação a temperatura e rotação. | 74 |
| Figura | 18 | Comportamento da produção de EPS em relação ao pH e rotação. | 75 |
| Figura | 19 | Gráfico da cinética de produção em condições operacionais otimizadas. | 76 |
| Figura | 20 | Gráfico da cinética de produção nas condições pré e pós-otimização. | 76 |
| Figura | 21 | A e B representa o aspecto do EPS após a precipitação em álcool e C representa o aspecto após a centrifugação. | 78 |
| Figura | 22 | Viscosidade aparente de soluções aquosa do EPS sintetizado por <i>Enterobacter amnigenus</i> em diferentes concentrações. | 79 |
| Figura | 23 | Viscosidade aparente de soluções aquosa com 1% de EPS sintetizado por <i>Enterobacter amnigenus</i> em diferentes temperaturas. | 79 |
| Figura | 24 | Viscosidade aparente de soluções aquosa com 1% de EPS sintetizado por <i>Enterobacter amnigenus</i> em diferentes concentrações de NaCl. | 80 |
| Figura | 25 | Espectro realizado na região do infravermelho do polímero comercial. | 81 |
| Figura | 26 | Espectrometria na região do infravermelho do polímero sintetizado por <i>Enterobacter amnigenus</i> . | 83 |
| Figura | 27 | Termograma de análise termogravimétrica do biopolímero sintetizado por <i>Enterobacter amnigenus</i> | 84 |
| Figura | 28 | Gráfico representativo de produção de polímero em diferentes condições nutricionais | 85 |
| Tabela | 01 | Polímeros com aplicação comercial. | 20 |
| Tabela | 02 | Fontes alternativas de carbono provenientes da agroindústria na produção de polímero. | 35 |
| Tabela | 03 | Diferentes fontes de carbonotestada com as cepas <i>Enterobacter</i> sp. | 46 |
| Tabela | 04 | Planejamento experimental das concentrações de fonte de carbono. | 51 |
| Tabela | 05 | Planejamento experimental das porcentagens da concentração do inoculo no meio de produção. | 51 |

| | | | |
|--------|----|--|----|
| Tabela | 06 | Variáveis e níveis da Metodologia de Superfície de Resposta. | 51 |
| Tabela | 07 | Planejamento da Metodologia de Superfície de Resposta. | 52 |
| Tabela | 08 | Provas bioquímicas das cepas CCMICS 544 e CCMICS 549. | 57 |
| Tabela | 09 | Desempenho das cepas CCMICS 544 e 549 . | 60 |
| Tabela | 10 | Análise das CCMICS 544 e 549 em diferentes fontes de carbono. | 62 |
| Tabela | 11 | Análise da variância ANOVA, concentração de fonte de carbono. | 69 |
| Tabela | 12 | Média e variância da concentração de inóculo. | 69 |
| Tabela | 13 | Análise da relação entre as concentrações de inóculo. | 69 |
| Tabela | 14 | Matriz experimental das variáveis. | 71 |
| Tabela | 15 | ANOVA modelo polinomial quadrático. | 72 |
| Tabela | 16 | Análise de variância da produção do polímero | 77 |
| Tabela | 17 | Análise estatística A NOVA dos polímeros produzidos pós otimização do Superfície de Resposta | 78 |
| Tabela | 18 | Produção de biopolímero utilizando resíduos da indústria petroquímica | 85 |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 | OBJETIVO GERAL | 18 |
| 2.1 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 18 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 19 |
| 3.1 | SOBRE O MICRO-ORGANISMO OBJETO DO ESTUDO | 19 |
| 3.2 | EXOPOLISSACARÍDEO MICROBIANO | 19 |
| 3.2.1 | Exopolissacarídeos Explorados Comercialmente | 20 |
| 3.3 | PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DE XOPOLISSACARÍDEOS | 21 |
| 3.3.1 | Constituição química de alguns EPS microbianos | 23 |
| 3.3.2 | Indústria farmacêutica | 25 |
| 3.3.3 | Indústria de Alimentos | 25 |
| 3.3.4 | Indústria Petrolífera | 26 |
| 3.4 | PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS | 27 |
| 3.4.1 | Seleção de linhagem de cepas produtoras de biopolímeros | 28 |
| 3.4.2 | Importância do inóculo | 29 |
| 3.4.3 | Condições operacionais | 30 |
| 3.4.3.1 | <i>Temperatura</i> | 30 |
| 3.4.3.2 | <i>pH</i> | 31 |
| 3.4.3.3 | <i>Rotação e aeração</i> | 32 |
| 3.4.4 | Síntese microbiana | 32 |
| 3.4.5 | Composição do meio | 33 |
| 3.4.6 | Utilização de resíduos | 35 |
| 3.4.6.1 | <i>Água produzida da indústria de petróleo</i> | 37 |
| 3.5 | IMPORTÂNCIA AMBIENTAL DA UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS NA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS | 39 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 3.6 | IMPORTÂNCIA ECONÔMICA | 40 |
| 3.7 | IMPORTÂNCIA CIENTÍFICA | 42 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 43 |
| 4.1 | CEPAS DO GÊNERO <i>Enterobacter</i> PRODUTORAS DE BIOPOLÍMEROS | 44 |
| 4.1.1 | Sobre os micro-organismos | 44 |
| 4.1.2 | Caracterização macroscópica e microscópica | 44 |
| 4.1.3 | Testes bioquímicos | 45 |
| 4.2 | TESTES PRELIMINARES E CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DE APENAS UMA CEPA PARA PROSSEGUIR COM OS TESTES DE PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS | 45 |
| 4.2.1 | Testes preliminares com fonte de carbono e NaCl em diferentes faixas de temperatura e pH | 45 |
| 4.2.2 | Cinética de crescimento | 46 |
| 4.2.3 | Produção de biopolímero em Meio Mínimo Mineral Marinho em diferentes fontes de carbono | 46 |
| 4.2.4 | Metodologias aplicadas para a produção do biopolímero | 47 |
| 4.2.4.1 | <i>Preparação de pré-inóculo</i> | 47 |
| 4.2.4.2 | <i>Preparação para produção do polímero</i> | 47 |
| 4.2.4.3 | <i>Preparação para a recuperação do polímero</i> | 48 |
| 4.2.5 | Composição dos meios utilizados | 48 |
| 4.3 | IDENTIFICAÇÃO DA CEPA SELECIONADA ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO UTILIZANDO O GENE 16S rRNA | 49 |
| 4.4 | AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO COM MEIO SINTÉTICO MARINHO | 49 |
| 4.4.1 | Cinética de crescimento com Meio Mínimo Mineral Marinho | 49 |
| 4.4.2 | Cinética de produção | 50 |
| 4.4.3 | Testes para avaliar a concentração de fonte de carbono e concentração de inóculo no meio de produção | 50 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 4.5 | OTIMIZAR AS CONDIÇÕES OPERACIONAIS | 51 |
| 4.5.1 | Metodologia Superfície de Resposta (RSM) | 51 |
| 4.5.1.1 | <i>Controle da temperatura</i> | 52 |
| 4.5.1.2 | <i>Controle do pH</i> | 52 |
| 4.5.1.3 | <i>Controle da agitação</i> | 53 |
| 4.5.2 | Cinética de produção pra validar otimização | 53 |
| 4.6 | CARACTERIZAR AS PROPRIEDADES DO BIOPOLÍMERO PRODUZIDO | 53 |
| 4.6.1 | Testes de viscosidade | 53 |
| 4.6.2 | Teste infravermelho | 54 |
| 4.6.3 | Teste de termogravimetria | 54 |
| 4.7 | COMPARANDO PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO POR <i>Enterobacter amnigenus</i> COM MEIO DE PRODUÇÃO A BASE DE ÁGUA PRODUZIDA | 55 |
| 4.8 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 55 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 56 |
| 5.1 | CEPAS DO GÊNERO <i>Enterobacter</i> PRODUTORAS DE BIOPOLÍMERO | 56 |
| 5.1.1 | Aspectos macroscópicos e microscópicos | 56 |
| 5.1.2 | Provas bioquímicas | 56 |
| 5.2 | TESTES PRELIMINARES PARA SELEÇÃO DA CEPA PRODUTORA DE BIOPOLÍMERO | 59 |
| 5.2.1 | Testes preliminares com fonte de carbono e NaCl em diferentes faixas de temperatura e pH | 59 |
| 5.2.2 | Cinética de crescimento | 60 |
| 5.2.3 | Produção de biopolímero em Meio Mínimo Mineral Marinho com diferentes fontes de carbono | 62 |
| 5.3 | IDENTIFICAÇÃO DA CEPA SELECIONADA ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO UTILIZANDO O GENE 16S rRNA | 63 |
| 5.4 | AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO COM MEIO SINTÉTICO MARINHO | 64 |
| 5.4.1 | Cinética de crescimento com meio de produção | 64 |
| 5.4.2 | Cinética de produção | 66 |

| | | |
|-------|---|------------|
| 5.4.3 | Concentração da fonte de carbono e concentração do inóculo celular | 67 |
| 5.5 | OTIMIZANDO AS CONDIÇÕES OPERACIONAIS | 70 |
| 5.5.1 | Metodologia Superfície de Resposta (RSM) | 70 |
| 5.5.2 | Cinética de produção (validação experimental) | 75 |
| 5.6 | CARACTERIZAÇÃO DO BIOPOLÍMERO PRODUZIDO | 78 |
| 5.6.1 | Análise da viscosidade | 78 |
| 5.6.2 | Caracterização do biopolímero por espectroscopia infravermelho | 81 |
| 5.6.3 | Análise de termogravimetria | 83 |
| 5.7 | PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO POR <i>enterobacter amnigenus</i> COM MEIO DE PRODUÇÃO A BASE DE ÁGUA PRODUZIDA | 84 |
| 6 | CONCLUSÕES | 87 |
| | REFERÊNCIAS | 88 |
| | APÊNDICE A | 99 |
| | APÊNDICE B | 100 |
| | APÊNDICE C | 101 |
| | ANEXO A | 103 |

1. INTRODUÇÃO

Exopolissacarídeos (EPS) microbianos fazem parte de uma classe de biopolímeros hidrossolúveis produzidos por um grande número de micro-organismos. São materiais poliméricos com propriedades físicas e estruturais únicas que permitem a sua utilização numa ampla variedade de aplicações industriais (alimentos, têxteis, cosméticos e produtos farmacêuticos) como: estabilizantes, espessantes, gelificantes, emulsionantes e agentes de floculação (MORENO et al., 1998; SUTHERLAND, 1990). O EPS bacteriano pode apresentar vantagens significativas quando comparado a polissacarídeos tradicionais derivados de outras fontes naturais como as plantas, as algas e os animais. Por permitir o controle das condições de produção, a síntese de polissacarídeo microbiano pode ser mais rentável (ALVES et al., 2010). O EPS microbiano pode assim formar soluções viscosas com propriedades reológicas que podem ser utilizadas em baixas concentrações bem como resistir a amplas faixas de pH e temperatura (PACE, 1991; SOCCOL et al., 2000; ROTTAVA, 2005; REHM, 2010). A aplicação de biopolímero na indústria petrolífera, por exemplo, está ligada a estabilidade de suas propriedades reológicas em soluções salinas, e em ampla faixa de temperatura (NAVARRETE e SHAN, 2001). Uma das técnicas industriais mais comuns que utilizam significativa quantidade de polímero é a recuperação de campos maduros de petróleo. Essa substância pode ser adicionada a água de injeção em um processo de recuperação da pressão interna da formação rochosa onde o petróleo está depositado. O polímero aumenta a viscosidade da água permitindo que a mesma desloque o petróleo para fora do poço com maior eficiência (SHANSHAN et al., 2011; SEN, 2008).

Nas últimas décadas, várias cepas bacterianas foram identificadas e testadas por sua capacidade de produzir biopolímeros. Alguns EPSs bacterianos são considerados especiais e podem vir a substituir outros polissacarídeos de plantas usados convencionalmente. O GalactoPol, que é produzido pela *Pseudomonas oleovorans* e é composto basicamente por galactose, é um exemplo. O FucoPol, um outro exemplo, é caracterizado por possuir significativa concentração de fucose, um açúcar raro, e é sintetizado por *Enterobacter* sp. (FREITAS et al., 2011^{a,b}). Portanto, além das propriedades reológicas, esses biopolímeros podem ser também fontes importantes de substâncias de alto valor agregado.

A produção de EPS bacteriano pode ter um fator limitante que é o alto custo no processo de produção. A fonte de carbono utilizada para o crescimento microbiano é

geralmente responsável pelos custos do sistema de produção. Sugere-se que esta limitação pode ser superada através da substituição de substratos tradicionais por fontes de carbono alternativas e de baixo custo como, por exemplo, os resíduos industriais (KUMAR et al.,2007; PRADELLA, 2006; MESOMO, 2007; ROTTAVA, 2005). Mediante tais perspectivas a meta do presente estudo é a de testar o potencial da *Enterobacter* sp. para produzir polissacarídeos a partir de condições semelhantes as encontradas com os resíduos da indústria de petróleo. Outros objetivos incluem otimizar a produção em escala laboratorial e possível ampliação, viabilizando o bioprocessos para posteriormente vir a ser aplicada na indústria petrolífera.

2. OBJETIVO GERAL

Produzir biopolímero a partir do micro-organismo *Enterobacter* sp. em meio suplementado com resíduos da indústria petroquímica no processo de produção.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar testes preliminares (temperatura, pH, concentrações de carbono, concentração de sal, meios de cultura) com cepas de *Enterobacter* sp., para selecionar a melhor cepa produtora;
- Avaliar a produção de biopolímero com Meio Mínimo Mineral Marinho, e diferentes concentrações da melhor fonte de carbono;
- Otimizar as condições operacionais: Temperatura, pH, tempo, agitação, composição do meio de produção, através da Metodologia de Superfície de Resposta;
- Realizar teste cinético do ótimo de produção;
- Quantificar e caracterizar as propriedades visco-elásticas do biopolímero produzido.
- Produzir biopolímeros utilizando resíduos da indústria de petróleo e biodiesel, com meio a base de água produzida.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SOBRE O MICRO-ORGANISMO OBJETO DO ESTUDO

As bactérias do gênero *Enterobacter*, são bacilos Gram-negativos amplamente distribuídos na natureza e são encontrados no solo, na água, em vegetais e no trato digestivo de humanos e animais (KONEMAN et al., 2010).

Algumas cepas de *Enterobacter* podem sintetizar EPSs específicos com propriedades únicas que podem ser aplicados em diversos segmentos industriais (FREITAS et al., 2011^a; TORRES et al., 2012). Por exemplo, isolada a partir de beterraba a *Enterobacter amnigenus* foi identificada como produtora de um EPS rico em L-fucose. A fucose é um açúcar raro com utilidade nas indústrias farmacêuticas e cosméticas. (FREITAS et al., 2011^a; TORRES et al., 2012). O biopolímero a base de fucose tem propriedades gelificante e espessante únicas (CESCUTTE, 2005). Por outro lado, a *Enterobacter cloacae* (Z0206) pode sintetizar um EPS composto de uma mistura de L-fucose, D-glicose, D-galactose, D-glucorônico e ácido pirúvico, com proporção molar aproximada de 2:1:3:1:1 (WANG et al., 2013). Esse tipo de biopolímero com fucose na sua estrutura molecular pode ser utilizado como substâncias de significativo valor comercial. A *Enterobacter sp.* A47(DSMZ 23139), isolada de subproduto em solução aquosa de glicerol, pode também sintetizar um EPS rico em fucose, galactose, glucose, piruvato, succinato e acetato com proporção molar 1.6:1.3:1.1:1.2:0.7:1.5 respectivamente.

A *Enterobacter cloacae* WD7 produz exopolissacarídeo com alto potencial de floculação (PRASERTSAN et al., 2008) e também com propriedade emulsificante e por isso tem atraído grande interesse da indústria petroquímica (LYER, 2005).

3.2 EXOPOLISSACARÍDEO MICROBIANO

Os biopolímeros são classificados de acordo com a sua composição química, podendo ser à base de carboidratos, ácidos graxos ou proteínas (REHM, 2010; PRADELLA, 2006). Na maioria dos casos os biopolímeros microbianos são macromoléculas formadas por carboidratos monossacarídeos e/ou derivados ácidos

graxos. Os polissacarídeos são divididos em três grupos, de acordo com a sua localização na célula: (i) intracelular, localizado no interior da célula ou como parte da membrana citoplasmática; (ii) na parede celular, formados como parte estrutural das células; e (iii) polissacarídeos extracelulares (EPS), com suas subunidades produzidas no interior da célula, sendo posteriormente secretados e montados no exterior da mesma (SUTHERLAND, 1982).

A produção de EPS está relacionada à capacidade dos micro-organismos sobreviverem em condições adversas. Os EPSs microbianos desempenham diferentes papéis como: proteger o micro-organismo contra desidratação e servir de barreira impedindo o ataque de vírus e antimicrobianos. Pode ainda neutralizar toxinas ou alterar a biodisponibilidade de íons metálicos tóxicos. Em algumas situações, o EPS pode ainda servir como fonte de carbono e energia (PACE, 1991; MOREIRA, 2002).

3.2.1 Exopolissacarídeos Explorados Comercialmente

Vários polímeros bacterianos são produzidos comercialmente em larga escala, aproximadamente 20.000 toneladas por ano, sendo mais comum a produção de xantana e dextrana (REHM, 2010). A tabela 01 expõe os polímeros mais comercializados.

Tabela 01- Polímeros com aplicação comercial.

| Polímero | Micro-organismos | Propriedades | Aplicação Industrial | Referência |
|--------------|------------------------------|---|--|---|
| Goma Xantana | <i>Xantomonas campestris</i> | Espessante Estabilizante Emulsionante Alta viscosidade | Alimentos Farmacêutica Petrolífera | Garcia-Ochoa et al., (2000). Rottava et al., (2009). |
| Gelana | <i>Sphingomonas</i> sp. | Gelificante Plasticidade Estabilizante térmico | Alimentos | Coleman et al., (2008). Morris (2012). |

Tabela 01- Polímeros com aplicação comercial. Continuação

| | | | | |
|----------------------|--|--|--|---|
| Welana | <i>Sphingomonas</i> sp. | Gelificante Viscosidade Estabilizante térmico | Alimentos. Farmacêutica Petroquímica | Berwanger et al., (2006) |
| Ácido Hialurônico | <i>Streptococcus</i> (grupo A e B) | Viscoelasticidade | Indústria médica e cosmética | Huang et al., (2007). Pires et al., (2010). |
| Alginato | <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Azotobacter</i> sp. | Estabilizante Espessante Gelificante | Alimentos | Borzani e Schmidell (2001). Garcia-Cruz e Foggetti (2008). |
| Dextrana | <i>Acetobacter</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Streptococcus</i> | Estabilizante Espessante (pode modificar a dependência da linhagem bacteriana) | Alimentos Cosméticos Farmacêutica | Aman et al.,(2012). |

3.3 PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DE EXOPOLISSACARÍDEOS

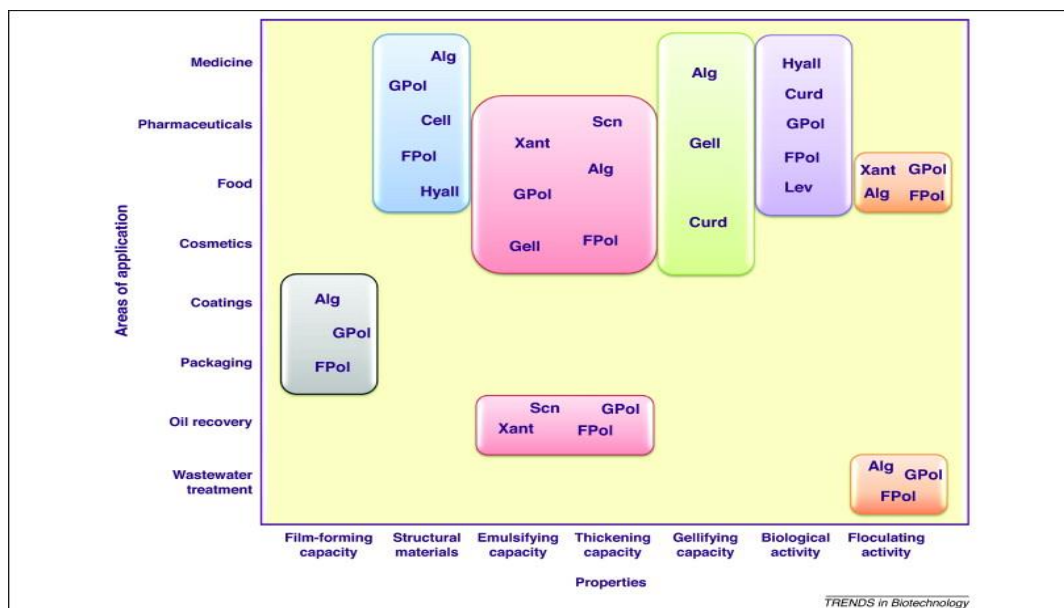
As propriedades dos EPSs microbianos são determinadas a partir da sua constituição química, estrutura molecular, peso molecular e a sua composição de carboidratos. É comum encontrar vantagens para descrever os polímeros bacterianos em comparação ao polímero vegetal ou animal. O balanço energético para a síntese de

polissacarídeo microbiano pode ser mais rentável (ALVES et al., 2010; FREITAS et al., 2011^a).

Os exopolissacarídeos microbianos, despertam interesses em diversas áreas industriais (alimentícias, farmacêuticas e petroquímicas) principalmente por possuírem propriedades reológicas, que permitem a formação de soluções viscosas em ampla faixa de pH temperatura e alta estabilidade em soluções aquosas (GARCIA-OCHOA et al., 2000; ROSALAN e ENGLAND, 2006; FREITAS et al., 2011^a). A Figura 01 resume algumas propriedades e tipos de polissacarídeos de aplicações industrial.

Comumente a indústria do petróleo usa os biopolímeros como fluidos de perfuração e em processos especiais avançados de recuperação de petróleo (GARCIA-OCHOA et al., 2000; ROTTAVA, 2005; LUVIELMO e SCAMPARINI, 2009).

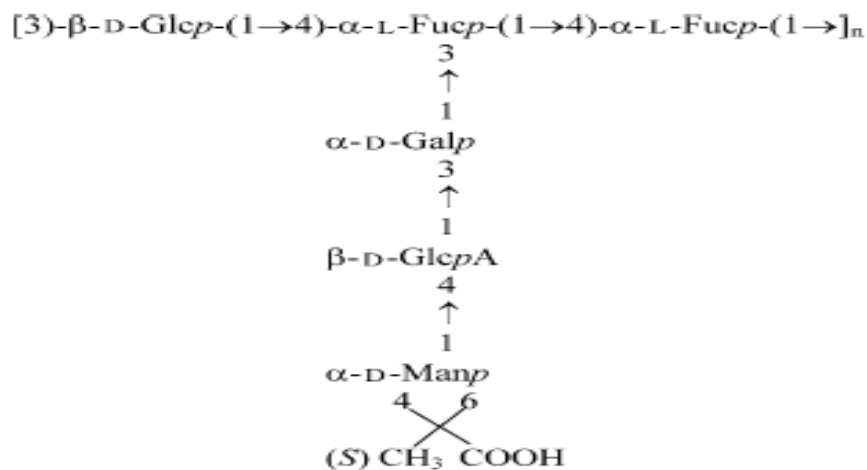
Figura 01- Diagrama que representa a correlação entre as propriedades de polissacarídeos mais relevantes com as suas principais áreas de aplicação. Abreviações: ALG, alginato bacteriano; Fpol, FucoPol; Gell, goma de gel; GPol, GalactoPol; Hyall, ácido hialurônico; Lev, Levan; SCN, succinoglicano; Xant, goma xantana (FREITAS et al., 2011^a).



3.3.1 Constituição química de alguns EPS microbianos

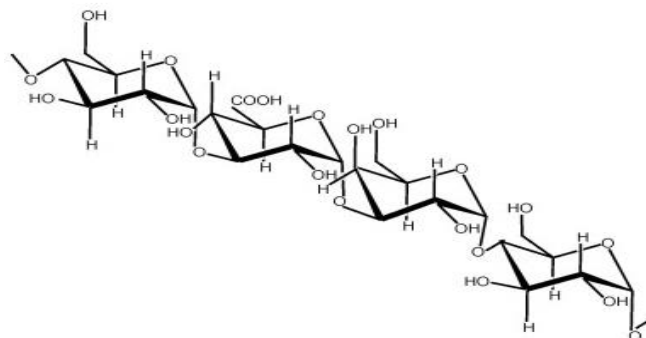
A Figura 2 mostra a estrutura do polissacarídeo formado por glicose, D-galactose, L-fucose e D-manose produzido pela *Enterobacter amnigenus*. Além de ser um polissacarídeo com características espessante, gelificante e emulsionante únicas, o EPS produzido por *Enterobacter amnigenus* contém um açúcar (fucose) de difícil obtenção. Por esse motivo esse biopolímero pode ter utilidade nas indústrias farmacêuticas cosméticas alimentícias e petrolíferas (CESCUTTI et al., 2005; FREITAS et al., 2011^b).

Figura 02 - Estrutura química do EPS produzido por *Enterobacter amnigenus* (CESCUTTI et al., 2005).



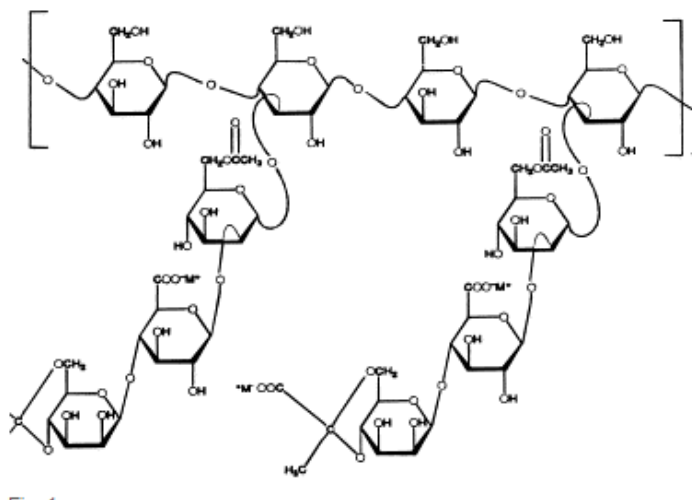
Enterobacter cloacae isolada a partir de solo contaminado de petróleo, é capaz de produzir exopolissacarídeo em meio salino mineral utilizando N-hexadecano como única fonte de carbono. O EPS produzido tem sua composição constituída principalmente de estrutura monomérica com repetidas unidades de glicose e galactose (Figura 03). Esse mesmo EPS tem capacidade de emulsificar hexadecano e assim aumentar a sua solubilidade aquosa no ambiente (HUA et al., 2010). Portanto, esse exopolissacarídeo tem significativa importância no processo de biorremediação.

Figura 03- Estrutura do EPS extraído de *Enterobacter cloacae*, com unidades repetidas de glicose e galactose (HUA, 2010).



A goma xantana é um heteropolissacarídeo produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris*. As estruturas primárias consistem de duas unidades de glicose, duas unidades de manose e uma unidade de ácido glucurônico. A sua cadeia principal é constituída por β - D- glicose ligadas nas posições 1 e 4. As cadeias laterais do trissacarídeo contêm uma unidade de ácido D-glucurônico entre duas unidades de D-manose ligados na posição 3- O de qualquer outro resíduo de glicose na cadeia principal (Figura 04). Sua principal característica é a de modificar a reologia ou o comportamento de fluxo das soluções, estas propriedades são determinadas pela sua composição química, arranjos e ligações moleculares (GARCIA-OCHOA et al., 2000).

Figura 04 - Estrutura da goma xantana (GARCIA-OCHOA et al., 2000).



3.3.2 Indústria farmacêutica

Alguns Exopolissacarídeos bacterianos possuem a capacidade de estabelecer matrizes poliméricas, que permitem a manipulação *in vitro*, para moldar e/ou estruturar materiais como por exemplo, nanopartículas e hidrogéis, adaptando-os para aplicações biomédicas específicas e na composição de novos fármacos. A utilização de citosinas e compostos biologicamente ativos derivados de bactérias, funcionam como Modificadores da Resposta Biológica (MRB), para tratamentos contra cânceres. Estudos tem revelado que a goma xantana exerce efeitos antitumorais, e que a sua segurança por administração oral já está bem estabelecida (TAKEUCHI et al., 2009).

Fucopol, um exopolissacarídeo com alto teor de fucose tem alto potencial na utilização em produção de cosméticos e produtos farmacêuticos. Várias espécies do gênero *Enterobacter*, têm sido relatadas com potencial de secretar exopolissacarídeos com fucose em sua composição (CESCUTTI et al., 2005; FREITAS et al., 2011^a).

Cepas de *Enterobacter sp.* A47 (DSM 23139) produz exopolissacarídeo composto por açúcares neutros (fucose, galactose e glucose) e o grupo acil (piruvato, succinato e acetato) e sua capacidade de floculação e estabilização em meio aquoso, torna-o altamente atrativo para a indústria (FREITAS et al., 2011^a).

3.3.3 Indústria de Alimentos

A grande maioria dos polissacarídeos utilizados nas indústrias de alimentos são derivados de plantas e algas. O biopolímero microbiano mais comumente utilizado industrialmente é a goma xantana, sua utilização foi aprovada em 1969 pelo FDA (*Food and Drug Administration*). Por ser compatível com a maioria dos colóides usados em alimentos, é um produto comumente encontrado em alimentos e remédios (LUVIELMO e SCAMPARINI, 2009). As propriedades toxicológicas da goma xantana foram exaustivamente estudadas. Xantana não é tóxico e não sensibilizante, não provoca irritação da pele e dos olhos e é de fácil digestão (GARCIA-OCHOA et al., 2000).

3.3.4 Indústria Petrolífera

O interesse por novas tecnologias no processo de recuperação de petróleo é crescente, utilizado como combustível e matéria prima das indústrias, principalmente a petroquímica, torna-o a maior parte da energia consumida atualmente no mundo. Processos biotecnológicos tem desempenhado um papel importante na recuperação de petróleo através de métodos especiais incluindo a utilização de micro-organismos e/ou seus produtos (MUSTAFA et al., 2003; SEN, 2008).

Em reservatórios de petróleo a recuperação do óleo é composta de diversas etapas: recuperação primária, secundária e terciária. Recuperação primária produz petróleo e gás usando a unidade de pressão natural do reservatório; Recuperação secundária consiste em estimular os poços de petróleo por injeção de fluidos (água ou gás natural) com objetivo de aumentar a pressão interna do reservatório estimulando a saída do óleo; A recuperação terciária inclui técnicas diferenciadas e sofisticadas de recuperação melhorada, que consistem em processos especiais para aumentar a capacidade de produção de óleo (térmicos, miscíveis, químicos, microbiológicos), (BACHMANN et al., 2014; SEM, 2008).

Diferentes processos de recuperação avançada de petróleo (EOR) são empregados na indústria petrolífera, os métodos empregados sempre estão associados às características do reservatório e do óleo bruto. Métodos térmicos: inundação de vapor, combustão e injeção de água quente; Químicos: injeção de solventes, polímeros, surfactantes, injeção de gás CO₂, N₂ e gases de combustão; Microbiológicos: corresponde à utilização de micro-organismos estimulando a produção de bioativos, para reduzir a viscosidade do óleo, aumentar a pressão do poço de petróleo favorecendo a recuperação do óleo (HARNER et al., 2011; SEN, 2008).

A adição de polímeros à água de injeção pode ser empregada nos fluidos de perfuração na recuperação secundária e terciária. Nos reservatórios em que o óleo apresenta alta viscosidade o polímero é utilizado melhorando o fluido, permitindo que o mesmo se mova penetrando os poros das rochas deslocando-se com a mesma mobilidade do óleo. Fluidos a base de água são os mais utilizados por serem considerados mais seguros (baixa toxicidade e bioacumulação). Os polímeros utilizados

em fluidos de injeção devem possuir propriedades como: alta viscosidade em baixa concentração (a viscosidade é a propriedade mais requerida na utilização de polímero para recuperação de petróleo), propriedades pseudoplásticas, estabilidade em altas temperaturas e salinidade. A goma xantana ainda é o polímero mais utilizado por possuir estabilidade à variação de pH, temperatura e força iônica (LAZAR et al., 2007; BORGES et al., 2009).

A recuperação melhorada de petróleo com utilização de micro-organismos MEOR é um dos métodos terciários utilizados para aumentar a recuperação de óleo, que envolvem a utilização de uma população microbiana mista e os produtos metabólicos incluindo biossurfactantes, biopolímeros, biomassa, ácidos, solventes, gases e também enzimas para aumentar a recuperação de petróleo (SEN, 2008). A utilização dos micro-organismos *in situ*, e injeção de nutrientes em condições que favoreçam a microbiota do reservatório, promove um crescimento exponencial e a produção dos seus metabólitos (produtos) mobilizando o óleo residual (GAO e ZEKRI, 2011). O sucesso da MEOR *in situ* está relacionado com a capacidade dos consórcios microbianos utilizados sobreviver e produzir metabólitos desejados nas condições adversas dos reservatórios (SEN, 2008).

A biotransformação de petróleo em reservatório é uma das alternativas para a recuperação de óleo, pois uma quantidade considerável de óleo fica preso nos reservatórios devido à baixa permeabilidade e alta viscosidade. A redução da viscosidade pode ocorrer por mecanismos microbianos: conversão microbiana de componentes de óleo mais pesados para os componentes de petróleo leve e produção de metabólitos microbianos que alterem a composição do óleo facilitando a sua recuperação (LAZAR et al., 2007; SOUDMAND-ASLI et al., 2007; GUDINÃ et al., 2012). Portanto, a utilização de biopolímeros ajuda a aumentar a viscosidade da água de injeção e assim melhorar o poder de recuperação de óleo da formação rochosa (MARCHANT, 2012).

3.4 PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS

Tem sido de grande interesse a produção de polissacarídeos utilizando micro-organismos com capacidade de sintetizar metabólitos a partir de diferentes

substratos por processos microbiológicos, dos quais esses metabolitos possam formar soluções viscosas em meio aquoso, goma e géis (BERWANGER, et al., 2006).

O processo de produção microbiológica de biopolímeros ocorre com as seguintes etapas: (i) pré-inóculo, (ii) inóculo, (iii) produção, (iv) pasteurização, desinfecção e esterilização (a depender da aplicação), (v) remoção das células, (vi) precipitação e (vii) separação e secagem. O crescimento dos micro-organismos, a produção e as propriedades dos biopolímeros sofrem influência de fatores como: o tipo de reator, o modo de operação (batelada ou contínuo), composição do meio, e as condições operacionais (temperatura, pH, rotação e concentração de oxigênio dissolvido no meio de produção) (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; ROTTAVA, 2005; BORGES, 2007). O ideal é que a produção desses biopolímeros seja efetuada em condições controladas de fermentação para aumentar a eficiência e garantir material de qualidade (LUVIELMO e SCAMPARINI, 2009).

3.4.1 Seleção de linhagem de cepas produtoras de biopolímeros

Uma das principais estratégias para o melhoramento no processo de produção fermentativa de exopolissacarídeos é a seleção de linhagem bacteriana (FREITAS et al., 2011^a). Diversos estudos com o objetivo de otimizar processos fermentativos de produção de exopolissacarídeos, evidencia uma dependência da linhagem utilizada na fermentação com as propriedades do polímero produzido. Triagem de micro-organismos produtores de polissacarídeos com propriedades funcionais que sejam economicamente interessantes é um desafio. Portanto a seleção da linhagem torna-se o primeiro passo para o processo de produção (LUVIELMO et al., 2007; BOZA, 2002).

Nos processos microbiológicos para a produção de biopolímeros, a cepa microbiana selecionada deve ser preservada por métodos que mantenham suas propriedades, devendo, portanto, ser estocada por longo prazo para sempre ter disponíveis cepas puras e viáveis (LUVIELMO e SCAMPARINI, 2009).

Dentro das estratégias para o melhoramento dos processos microbiológicos a seleção de cepas produtoras e a manipulação gênica são perspectivas que interessam por influenciar no aumento e otimização da produção de EPS. O uso de ferramentas da

biotecnologia para a manipulação dos genes que codificam as enzimas que catalisam as reações dos percursos, alterando as vias reguladoras que afetam a expressão de genes e a atividade das enzimas, bem como alterações da expressão de genes individuais ou grupos de genes que manipulados podem aumentar a eficiência de conversão dos processos bioquímicos envolvidos, e, portanto, aumentar o rendimento de EPS (FREITAS et al., 2011^a).

3.4.2 Importância do inóculo

Uma das etapas iniciais no processo fermentativo é a produção do inóculo, que corresponde à etapa de preparação dos micro-organismos a partir de células estoques, a fim de obter células em estado fisiológico adequado a ser inoculado no meio de fermentação (CANUTO, 2006).

A qualidade e o tipo do inóculo interferem no processo microbiológico. A concentração celular, condições fisiológicas das células, tempo do preparo do inóculo são fatores que interferem consideravelmente no rendimento do processo e consequentemente na qualidade do polímero. Portanto todas as etapas de produção do inóculo devem ser monitoradas a fim de manter a viabilidade e produtividade das células (PAN et al., 2000).

De acordo com García-Ochoa et al., (2000), o objetivo durante a formação do inóculo é aumentar a concentração celular e manter a viabilidade da cultura. Além disso, o monitoramento das etapas do inóculo deve ocorrer a fim de suprimir a produção de polímero durante o processo (o biopolímero liberado no meio envolve as células dificultando a transferência de nutrientes e oxigênio levando as células à morte), pois as células devem estar adaptadas às condições que encontrarão no processo de fermentação. O volume de inóculo para fermentador de produção é de comumente entre 5 e 10% do volume total.

3.4.3 Condições operacionais

A produção de biopolímeros depende das condições operacionais como: fonte orgânica, temperatura, pH, agitação e/ou aeração. Alterações nesses fatores geram variações no rendimento e qualidade dos polímeros por limitar a via metabólica de produção ou alterar a sua composição estrutural (LUVIELMO e SCAMPARINI, 2009). A limitação da difusão de oxigênio é o exemplo mais evidente de fator controlador da via metabólica de produção de biopolímeros por bactérias aeróbias. A produção e acumulação desse composto na cultura aumenta a viscosidade do meio dificultando a difusão de oxigênio, por isso, os métodos de aeração são importantes para o rendimento do processo. Portanto, o controle do processo de fermentação garante rendimento e qualidade do produto (MESOMO, 2007). Para otimizar o processo de produção são necessários testes laboratoriais e assim definir as melhores condições de cultivo. A otimização dos parâmetros de controle do processo de fermentação pode ser obtida utilizando ferramenta estatística conhecida como Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) (RAZACK et al., 2013).

3.4.3.1 Temperatura

Estudos diversos mostram a influência da temperatura na produção de biopolímeros.

A temperatura da incubação de micro-organismos é um fator crítico na biossíntese de polissacarídeos. A maioria dos micro-organismos produtores de polissacarídeos comerciais são mesófilos. A temperatura para a produção depende do micro-organismo. A temperatura ótima para produção de EPS a partir de *Enterobacter cloacae* foi 30°C (PRASERTSAN et al., 2008).

Freitas et al., (2011^b), realizaram estudos interativos de temperatura e pH na produção de EPS com *Enterobacter*, para avaliar o impacto destas condições na produção do polímero. A produtividade específica máxima ocorreu com a temperatura a 30°C (produção: $7,50 \pm 0,31 \text{gL}^{-1}$), empregando temperatura de 20°C a cultura

apresentou crescimento celular lento. Por outro lado, em temperatura extremas de 15,9°C e 44,1°C a produção e crescimento foram afetados respectivamente, havendo uma queda significativa na produção (1,12 g L⁻¹).

Xanthomonas campestris foi cultivada em diferentes temperaturas (22 a 35°C), sendo que a temperatura ótima para o seu crescimento é 28°C (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). A temperatura para a produção de xantana depende da composição do meio, sendo que a grande maioria corresponde a 28°C ± 2 (CASAS et al., 2000).

A temperatura ótima para a produção de pululana depende da estirpe de *Aureobasidium* e varia entre 24 e 30 ° C. A biossíntese da levana depende de uma enzima extracelular chamada levan-sacarase. Esta enzima é o ponto-chave na produção de levana, a temperatura ótima para a síntese da levan-sacarase depende da cepa bacteriana: para *Zymomonas mobilis*, é de 0° C, enquanto que para a *Bacillus subtilis*, de é 10° C (DONOT et al., 2012).

3.4.3.2 pH

O pH influencia a produção de polissacarídeo e também o crescimento celular (PACE, 1991). Estudos realizados com objetivo de otimizar a produção da goma xantana, mostraram que o pH tem forte influência na constituição do polímero. A condição ótima para produção pH deve estar na faixa da neutralidade (ROSALAM e ENGLAND, 2006; CASAS et al., 2000).

GARCÍA-OCHOA et al., (2000), reportou que durante a produção do polímero há um decréscimo de pH para o valor em torno de 5.0. Portanto, o processo necessita de monitoramento e do controle constante do pH durante a produção da xantana.

O pH e temperatura também desempenham um papel vital na síntese de exopolissacarídeo por *Bacillus subtilis*. O pH influencia a fisiologia do micro-organismo pois afeta a solubilidade e absorção dos nutrientes, atividade enzimática e a morfologia da membrana celular.. O pH ótimo para a produção de EPS foi em torno 7-8 para o *Bacillus subtilis* (RAZACK et al., 2013).

Diversos estudos são realizados para definir as condições ideais para a síntese pululana. Estes estudos revelaram que a síntese máxima ocorreu a pH 4,5, enquanto que o crescimento máximo de *Aureobasidium pullulans* ocorreu em pH de 6,5

(RAVELLA et al., 2010). Portanto, nem sempre o melhor pH para produção de EPS corresponde ao melhor valor para produção de biomassa. Como um fator está ligado ao outro, Jiang (2010) relata que as condições ótimas de pH para a produção de pululana fica em torno de 5,5.

3.4.3.3 Rotação e aeração

A grande maioria dos exopolissacarídeos bacterianos são metabolizados em condições aeróbias. Para alguns tipos de EPSs é necessária a aeração máxima (Goma Xantana) (REHM, 2009).

Em estudos com *Enterobacter cloacae*, os maiores rendimentos foram correlacionados com o crescimento celular e os maiores níveis de oxigênio dissolvido. A oxigenação é geralmente feita através de ajuda mecânica e/ou hélices. A velocidade de rotação dessas hélices aumenta o contato entre o meio de cultura e o ar atmosférico. A agitação adotada como ótima geralmente corresponde a 200 rpm (BANDAIPHET e PRASERTSAN, 2006; PRASERTSAN et al., 2008).

Psomas et al., 2007; García-Ochoa et al., (2000), avaliaram condições operacionais com rotação entre 100-800 rpm. De acordo com os referidos autores o crescimento de biomassa e a produção de xantana alcançaram um máximo na velocidade de agitação fixada em 500 rpm.

3.4.4 Síntese microbiana

EPS microbiano é sintetizado intracelularmente e exportado para fora da célula onde as ações de enzimas finalizam o processo de polimerização (DONOT et al., 2012). Para produzir o EPS as células precisam de uma fonte de energia e carbono. Alguns micro-organismos são capazes de crescer anaerobiamente com glicerol como única fonte de carbono. Dentre eles algumas espécies de *Enterobacter* (*E. agglomerans*; *E. aerogenes*). O glicerol é assim metabolizado através da via oxidativa e redutiva (SILVA et al., 2009). Portanto o conhecimento do metabolismo do micro-organismo utilizado na produção do exopolissacarídeo desejado é extremamente importante para

que o meio de fermentação seja otimizado e adequado para o processo de produção (YANG, 2007).

3.4.5 Composição do meio

Geralmente a composição do meio que sustenta o processo microbiológico consiste de 2-4% de fonte de carbono (glicose, sacarose), 0,05-0,1% fonte de nitrogênio (extrato levedura, peptona, nitrato, amônia, ureia) fósforo e outros minerais. A otimização dos compostos do meio para o processo microbiológico promove melhoria no produto desejado e reduz os custos de produção (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; MESOMO, 2007; ZHAO et al., 2013).

Para otimizar o meio de cultura para produção de biopolímero por *Pseudomonas fluorescens* Zhao et al., (2013) utilizou como fonte de carbono sacarose, glicose, maltose e lactose e como fonte de nitrogênio peptona, extrato de carne, extrato de levedura, NaNO_3 , NH_4Cl , e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e sais inorgânicos FeCl_2 , ZnSO_4 , NaCl , CaCl_2 , MgSO_4 , MnSO_4 , BaCl_2 , FeCl_3 , e CuSO_4 . O meio em que a produção foi ótima era constituído de sacarose como fonte de carbono, extrato de leveduras como fonte de nitrogênio e cloreto de sódio (NaCl) como sais inorgânicos (ZHAO et al., 2013).

Para a produção de goma xantana, além da fonte de carbono, vários outros nutrientes são necessários: micronutrientes (potássio, fósforo, ferro e sais de cálcio), macronutrientes (nitrogênio), sendo que a glicose e a sacarose são as fontes de carbono mais utilizadas. No entanto, concentrações elevadas de fonte de carbono podem influenciar o rendimento da goma xantana, inibindo o crescimento celular, sendo que a concentração ideal fica em torno de 2-4%. O nitrogênio, nutriente essencial, pode ser fornecido por compostos orgânicos. A composição ótima do meio de produção para produção de xantana corresponde: sacarose ($40,0 \text{ g.L}^{-1}$), ácido cítrico ($2,1 \text{ g.L}^{-1}$), NH_4NO_3 ($1,114 \text{ g.L}^{-1}$), KH_2PO_4 ($2,866 \text{ g.L}^{-1}$), MgCl_2 ($0,507 \text{ g.L}^{-1}$), Na_2SO_4 ($0,089 \text{ g.L}^{-1}$), H_3BO_3 ($0,006 \text{ g.L}^{-1}$), ZnO ($0,006 \text{ g.L}^{-1}$), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($0,020 \text{ g.L}^{-1}$), CaCO_3 ($0,020 \text{ g.L}^{-1}$), e HCl concentrado ($0,13 \text{ mL.L}^{-1}$), sendo o pH ajustado para 7,0 acrescentando NaOH (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

O *Lactobacillus rhamnosus* sintetiza EPS com atividades bifidogênicas (estimula o crescimento de bifidobactérias) e também antioxidantes. A composição do

EPSs produzido por *Lactobacillus rhamnosus* depende da fonte de carbono utilizada no meio de crescimento. EPS com atividade bifidogênica elevada foi obtido com meio suplementados com galactose, lactose e maltose como única fonte de carbono; e efeitos antioxidantes em EPSs isolado a partir de meios de cultura enriquecidos com galactose, lactose e sacarose (BERECKA et al., 2013).

A produção de exopolissacarídeo com propriedades flocculantes foi sintetizado pelo micro-organismo *Azotobacter indicus*, utilizando extrato da planta *Madhuca latifolia* como fonte de carbono. A composição do meio (g. L⁻¹) com obtenção máxima de bioflocculante consiste em: extrato de flor, (20,0g.L⁻¹); extrato de levedura, (0,50g.L⁻¹); ortofosfato de potássio, (0,200g.L⁻¹); FeSO₄, (0,040g.L⁻¹), carbonato de cálcio, (1,0g.L⁻¹) ; MgSO₄, (0,50g.L⁻¹), pH ajustado para 7,0. A fermentação conduzida a 29 ° C por 172 horas. A *Azotobacter indicus* pode converter de 30 a 50% da fonte de carbono fornecido na forma de açúcares no extrato da flor em EPS flocculante (PATIL et al., 2009).

Um estudo realizado com *Bacillus circulans*, isolado de uma amostra de água marinha foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o potencial do micro-organismo em utilizar diferentes fontes de carbono para sintetizar um biopolímero (Biosurfactantes). O meio marinho Zobell foi utilizado para a manutenção da cultura e preparação do inóculo, para o caldo de fermentação (meio salino mineral) suplementado com glicerol, glicose, sacarose e amido. Dentre as diversas fontes de carbono utilizadas o glicerol favoreceu um uma maior produção de biosurfactante (DAS et al., 2009).

A glicose e a sacarose são citadas na literatura como fontes preferenciais de carbono na produção de biopolímeros. Devido ao alto custo destas fontes de carbono, várias são as tentativas de se buscar fontes alternativas de substratos. Recentemente, muita atenção tem sido devotada ao uso de resíduos ou subprodutos industriais (KUMAR et al., 2007).

3.4.6 Utilização de resíduos

Devido ao mercado crescente na utilização de polissacarídeos, alto valor agregado e necessidade de redução no custo de produção, estudos diversos tem sido realizados com o uso de resíduos industriais na produção de biopolímeros (MESOMO, 2007).

O Brasil segue uma tendência mundial de incremento e consumo de biopolímeros, apesar de sua utilização na sua totalidade ainda ser importada. O Brasil tem grande potencial de investir em fabricação de biopolímeros em escala industrial, já que dispõe de matéria-prima básica para a produção (açúcar, álcool), e de baixo custo quando comparado a outros países. Por esse motivo tem aumentado o interesse por substratos alternativos como resíduos industriais (agroindústria, petroquímica) (ROTTAVA, 2005; MESOMO, 2007).

Para que seja possível a utilização de resíduos agroindustriais como meio alternativo em processos fermentativos é necessário testar a produtividade dessa fonte de carbono no processo. A Tabela 02 exemplifica algumas fontes alternativas de carbono proveniente de resíduos agroindustriais utilizados na produção de biopolímeros. Portanto, a redução dos custos está relacionada com o preço e disponibilidade da fonte de carbono e da quantidade de produto produzido (WOICIECHOWSKI, 2001).

Tabela 02 - Fontes alternativas de carbono provenientes da agroindústria na produção de polímero.

| Resíduo | Biopolímero | Micro-organismo | Referência |
|--|---|---|----------------------------|
| Soro de queijo da indústria de laticínio | Goma xantana | <i>Xanthomonas campestris pv. mangiferaeindicae</i> | Mesomo, 2007. |
| Melaço bruto e resíduo de proteína texturizada de soja | Foram produzidos vários biopolímeros dentre eles a goma gelana. | <i>Sphingomonas capsulata</i> | Berwanger et al., 2006. |
| Suco de maçã | Goma xantana | <i>Xanthomonas campestris pv. Maniothis</i> | Druzian e Pagliarin, 2007. |
| Soro de mandioca (resíduo extração de polvilho) | Goma xantana | <i>Xanthomonas campestris</i> | Brandão et al., 2010. |

O glicerol, principal componente dos triglicerídeos, é um composto abundante na natureza, e muitos micro-organismos podem naturalmente utilizá-lo como fonte de carbono e energia. No entanto, a energia contida no glicerol é menor que a encontrada na glicose ou sacarose. Portanto, a substituição de fontes de carbono como glicose, sacarose ou amido depende de testes para determinar as melhores condições de uso (SILVA et al., 2009).

Ultimamente os subprodutos da indústria do biodiesel têm atraído muito a atenção de pesquisa para ser utilizado como fonte de carbono na produção de exopolissacarídeos. Com o aumento da produção de biodiesel existe um significativo acúmulo de glicerol residual de baixo custo. No processo de produção do biodiesel o glicerol gerado fica em média de 10 a 20% do volume total do biodiesel produzido. A produção do bio-etanol, também gera o glicerol como um subproduto, até 10% do peso do açúcar consumido (THOMPSON e HE, 2006; BORZANI e SCHMIDELL, 2001). Freitas et al., (2009), demonstrou a produção de biopolímero por *Pseudomonas oleovorans* utilizando glicerol como única fonte de carbono. O produto resultante apresentou propriedades emulsificante e flocculantes podendo ser aplicado em diversos ramos da indústria de alimentos, farmacêutica, de cosméticos, têxteis, papel e petróleo (FREITAS et al., 2009). A *Enterobacter* é capaz de sintetizar um EPS contendo fucose a partir do glicerol. O EPS produzido possui elevada capacidade estabilizadora de emulsão com capacidade de estabilizar hidrocarbonetos. Naquele estudo a capacidade de emulsificação foi mais elevada do que a xantana e o alginato. Este EPS tem potencial para ser utilizado como um composto ativo de superfície, característica amplamente utilizada na indústria do petróleo e derivados (FREITAS et al., 2011^a).

É importante destacar que o glicerol obtido após produção do biodiesel é inadequado como matéria-prima para aplicação industrial, possui impurezas limitando a sua aplicabilidade. Portanto a purificação é necessária para converter o subproduto impuro (glicerol bruto) em glicerol puro com propriedades para a utilização industrial. Diversos métodos são utilizados para a purificação do glicerol bruto: Destilação, filtração, tratamento químico, adsorção (utilizando carvão ativado), permuta iônica (utilizando resina), extração, cristalização e decantação. A destilação é um dos métodos mais comumente praticados para purificação, pois é um método simples e eficiente para purificar o glicerol bruto com alto teor de sais e matéria orgânica não-glicerol. Durante o processo de purificação dois ou mais métodos são combinados com o objetivo de

alcançar maior eficiência de purificação (TAN, 2013). Portanto, o uso direto do glicerol residual representa não apenas uma redução de custo para a produção de biopolímeros, mas também um método alternativo de tratamento dessa substância.

Em estudos realizados com resíduos da indústria de petróleo, Ramos (2011) produziu goma xantana em meio à base de água produzida suplementada com glicerina bruta e sacarose. O exopolissacarídeo apresentou comportamento reológico pseudoplástico, e viscosidade compatível com goma comercial avaliada em literatura.

3.4.6.1 Água produzida da indústria de petróleo

A água produzida é o efluente resultante do processo de recuperação do óleo. Para recuperar a pressão de poços maduros de petróleo muitas empresas injetam água na formação rochosa para facilitar a retirada do petróleo. Portanto, o volume da água produzida está diretamente ligado com a vida útil do reservatório, pois, o volume de água de produção pode chegar a exceder dez vezes ou até mais o volume de produção de óleo (HENDERSON et al., 1999; SILVA, 2000).

Caso a água de injeção seja a própria água do mar, o efluente produzido pode conter alta salinidade, metais em percentuais variados, óleo (hidrocarbonetos) em suspensão e produtos químicos (desemulsificantes, anti-espumantes) comumente usados no processo de separação do óleo. A composição depende das características do reservatório (localização e formação geológica do campo, tempo de vida dos reservatórios, e do tipo de hidrocarboneto produzido) e profundidade (HENDERSON et al., 1999; SILVA 2000; GOMES, 2009, AHMADUN et al., 2009). Segundo Hansen e Davies, (1994); Faksness e Grini, (2004), Ahmadun et al., (2009), os principais compostos da água produzida incluem:

- Petróleo dissolvido e disperso;

Uma mistura de hidrocarbonetos, incluindo benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX), naftaleno, phenantherene, dibenzotiofeno (NPD), hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH) e fenóis.

- Minerais

Os compostos orgânicos e a formação rochosa pode gerar cátions (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Fe^{2+}), ânions (Cl^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , HCO_3^-) e

vários metais pesados (cádmio, o crômio, o cobre, o chumbo, mercúrio, níquel, prata, zinco).

- Compostos químicos

Alguns compostos químicos são utilizados nos processos operacionais durante a recuperação do petróleo como, por exemplo: inibidores de incrustação e corrosão, biocidas, desemulsificante, antiespumante e produtos químicos de tratamento de água.

- Sólidos e Gases

Os gases mais comuns em água produzida são CO_2 , O_2 e H_2S . No entanto, a produção de compostos corrosivos como o H_2S produzido por bactérias redutoras de sulfato as BRS podem promover corrosão e até mesmo a acidificar o petróleo.

A água de produção (água resultante da separação do óleo durante o processo de produção de petróleo), também chamada de “água produzida” pode também ser destinada à recuperação de óleo. No entanto, para melhorar o processo de produção de petróleo pode ser empregada a água da formação e água doce captada em poços, porém esse processo é mais caro, embora possa reduzir os problemas associados com corrosão (SILVA, 2000).

O descarte da água produzida sem tratamento adequado pode poluir água superficiais e solo, no caso de poços no continente, ou a água e vida marinha, no caso de plataformas oceânicas. Muitos países produtores de petróleo tem se esforçado para encontrar métodos eficientes e de baixo custo para tratar a água produzida, bem como redirecionar a utilização da água após o tratamento. A reutilização ou reciclagem de água produzida podem incluir a re-injeção subterrânea para aumentar a produção de petróleo, a irrigação e uso industrial (controle de poeira, lavagem de veículos, usina, água de reposição e controle de incêndio) (AHMADUN et al., 2009). Portanto, a água produzida tem potencial para ser um produto de valor agregado (AHMADUN et al., 2009).

3.5 IMPORTÂNCIA AMBIENTAL DA UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS NA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS

De acordo com o MME (Ministério de Minas e Energia), o Brasil vai aumentar a produção de biodiesel nas próximas décadas. Este aumento é vantajoso para a matriz energética do país, no entanto, pouco uso tem sido previsto para o glicerol residual gerado nesse processo. Em média, 10-20% do volume de biodiesel gerado corresponde ao volume de glicerol acumulado como subproduto. Portanto a grande quantidade de glicerol gerado pode tornar-se um problema ambiental, uma vez que não pode ser descartado diretamente no meio ambiente e não possui o grau de pureza para outros usos industriais (QUISPE et al., 2013; LEONETI et al., 2012).

Vários estudos têm sido abordados para possíveis utilizações para o glicerol bruto ou residual. Estes estudos tem concentrado a sua atenção em produção de produtos químicos, aditivos para combustíveis automotivos, produção de etanol e metanol. Outros usos em potencial têm sido abordados como a ração animal e como fonte de carbono para produtos microbiológicos como biopolímeros (LEONETI et al., 2012).

Segundo a convenção do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) 393/07 Art. 5º O descarte de água produzida deverá obedecer à concentração média aritmética simples mensal de óleos e graxas de até 29 mg/L, com valor máximo diário de 42 mg/L. Na mesma convenção o Art. 9º cita que é vedado o descarte de água produzida em um raio inferior a dez quilômetros de unidades de conservação e a cinco quilômetros de áreas ecologicamente sensíveis. De acordo com esta resolução, está previsto em plataformas um monitoramento anual do descarte de água produzida, em que os seguintes parâmetros devem ser medidos: metais, radioisótopos, salinidade, temperatura, nitrogênio total e amoniacal; e ensaios de toxicidade crônica devem ser realizados em alguns organismos marinhos já padronizados.

De acordo com Souza e Furtado (2006) nas unidades da Petrobras o descarte da água produzida é a forma mais usada nestas unidades. O descarte pode ser feito em superfície (oceanos) ou em locais de formações não produtoras. Todo esse processo do descarte segue as regulamentações citadas do CONAMA 393/07.

Em um estudo realizado por Veil et al., (2005), o descarte de água produzida das plataformas de petróleo e gás no Golfo do México, podem estimular o crescimento exagerado de fitoplâncton causando a diminuição de O₂. Como posteriormente os fitoplâncton morrem, estes são decompostos por micro-organismos. O processo de decomposição consome o oxigênio nas águas promovendo condições de hipóxia, trazendo sérias consequências à vida marinha.

3.6 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A biotecnologia é uma ferramenta que tem dado suporte para uso de novas metodologias para a recuperação do petróleo que ainda encontra-se em poços que os métodos convencionais não conseguem recuperar. A MEOR é um método alternativo de recuperação que utiliza micro-organismos e seus produtos metabólicos. Esta metodologia é promissora já que pode aumentar a recuperação do óleo entre 10 a 40% e tem um custo menor se comparado a outros métodos de recuperação (BACHMANN, et al., 2014). A utilização de biopolímeros, por exemplo, é empregada na água de injeção como fluido de perfuração e na recuperação terciária. A utilização da goma xantana como espessante e estabilizante tornou-se crescente no campo petrolífero.

A goma xantana é um dos principais biopolímeros comerciais produzidas com uma produção mundial anual de 30 000 toneladas, o que corresponde a um mercado de \$ 408,000,000 (BORGES et al., 2009; KALOGIANNIS et al., 2003). O mercado de polissacarídeos ainda é dominado por polissacarídeos de plantas e algas. Este mercado foi avaliado em mais de \$4 milhões no EUA em 2008, com goma xantana sendo o único EPS bacteriano significativo, que representaram 6% do valor total de mercado. Para que novos polímeros surjam como produtos, *commodities* alternativos para a produção e redução de custo no processo deve ser pensada para a viabilização e otimização na produção de polímeros através da redução de custos de produção (FREITAS et al., 2011^a).

Alguns EPSs possuem propriedades únicas, que trazem novas oportunidades com grande potencial comercial a exemplo do GalactoPol composto por galactose sintetizado por *Pseudomonas oleovorans* e FucoPol contem fucose e sintetizado por *Enterobacter sp.* (FREITAS et al., 2011^{a,b}).

A produção de biopolímeros ainda é muito onerosa devido ao alto custo das fontes de carbono normalmente utilizada para sustentar esse processo. Portanto, o custo da fonte de carbono é um fator limitante para o barateamento do produto final. Esta limitação pode ser superada através da substituição desses substratos tradicionais por fontes de carbono de baixo custo como, por exemplo, resíduos industriais ou coprodutos, bem como a otimização no processo de produção. O uso de substratos alternativos mais econômicos pode resultar em menor custo do produto final (KUMAR et al., 2007; PRADELLA, 2006). O Brasil consome significativa quantidade de biopolímeros de origem importada. Portanto, o desenvolvimento de um processo biotecnológico de baixo custo para produção desse tipo de produto tem um grande potencial para causar significativo impacto econômico para as indústrias brasileiras. Além de abrir divisas em um mercado estimado de \$ 4 milhões no EUA em 2008.

Paralelamente à demanda brasileira por biopolímeros, existe também a produção e acúmulo de resíduos orgânicos de baixo valor comercial e que podem ser utilizados na produção de biopolímeros. O glicerol é um subproduto da transesterificação do biodiesel, podendo ser utilizado como fonte de carbono. Em uma estimativa realizada por Chávez (2008), o volume de glicerol para aquele ano seria de 105 milhões de litros, e que a projeção a partir de 2010 seria de 330 milhões de litros ao ano, no entanto, o consumo comercial de glicerol no Brasil é de apenas 40 toneladas por ano. Com o avanço do Programa Nacional do Biodiesel em 2011 foram fabricados 2,6 bilhões de litros do biocombustível e a produção estimada para 2020 é de 14,3 bilhões de litros. Em 2011 cerca de 260 mil toneladas foi gerado como subproduto do biodiesel, volume quase oito vezes superior à demanda, estimada em cerca de 40 mil toneladas (VASCONCELOS, 2012). Portanto, a utilização de glicerina como fonte de carbono na produção de biopolímero é providencial, já que é uma matéria-prima de baixo custo, com sua utilização em produção de novos produtos como polímero poderá passar a ser um produto com importância econômica. O Brasil também dispõe de matéria-prima básica (álcool, açúcar já que é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar) para a produção de biopolímeros, portanto apresenta situações favoráveis e competitivas frente a outros países, podendo tornar-se independente e competitivo na produção de biopolímero e contribuindo com a indústria petrolífera na recuperação de petróleo, e assim contribuindo para o desenvolvimento econômico do país (LEONETI et al., 2012; LUVIELMO et al., 2007; PADILHA, 2003).

3.7 IMPORTÂNCIA CIENTÍFICA

Com o objetivo de atender a demanda da utilização de EPSs bacterianos em diversos segmentos industriais, é crescente o interesse de pesquisa em produção de polissacarídeos bacterianos, sendo que os estudos são focados com o objetivo de otimizar e baratear o processo de produção. Essa otimização é feita através de testes laboratoriais e em escala piloto avaliando-se fatores como: (i) composição mineral do meio, (ii) concentração ideal da fonte de carbono sendo testada e (iii) design e operação do fermentador. A produção de biopolímero é caso específica tanto do ponto de vista do micro-organismo quanto da fonte de carbono utilizada para sustentar o processo. Além dessas variáveis biológicas, existem ainda as variáveis de controle de processo como aeração do meio e coleta do produto que podem também limitar a produção. Portanto, é de significativa importância científica listar e ranquear os fatores que diretamente influenciam no processo de produção de biopolímeros. Essa informação pode além de assegurar melhora nos rendimentos de produção ajudar a explicar outros fenômenos biológicos em situações parecidas, isto é, quando se usa o mesmo micro-organismo e/ou a mesma fonte de carbono.

Como atualmente são poucos os relatos encontrados na literatura científica, que relatem o uso da água produzida da indústria do petróleo na produção de polímeros, este estudo irá contribuir com dados que possibilitem estudos posteriores. Pesquisas diversas com água produzida são realizadas com a finalidade em avaliar a sua composição, toxicidade, e métodos adequados para o tratamento do efluente. Com os resultados destas pesquisas, protocolos poderão ser elaborados para serem aplicados em escalas industriais para o tratamento destes efluentes e posteriormente serem utilizado como matéria-prima para aplicação em diversos ramos (agricultura, pecuária, áreas industriais) (SILVA, 2000; GOMES, 2009; AHMADUN et al., 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram realizados em duas etapas:

1ª Etapa- Seleção de uma cepa produtora de biopolímero. (Figura 5).

2ª Etapa- Caracterização da produtividade do polímero da cepa com melhor desempenho (Figura 6).

Figura 05- Fluxograma da 1ª etapa de experimentos adotados para a seleção da cepa objeto de estudo para a produção de biopolímero.

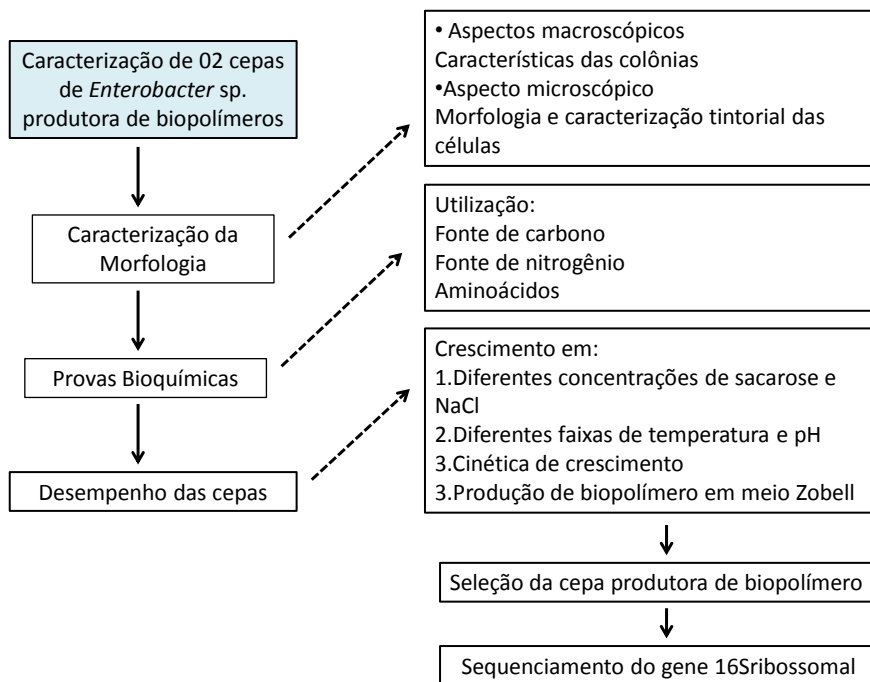
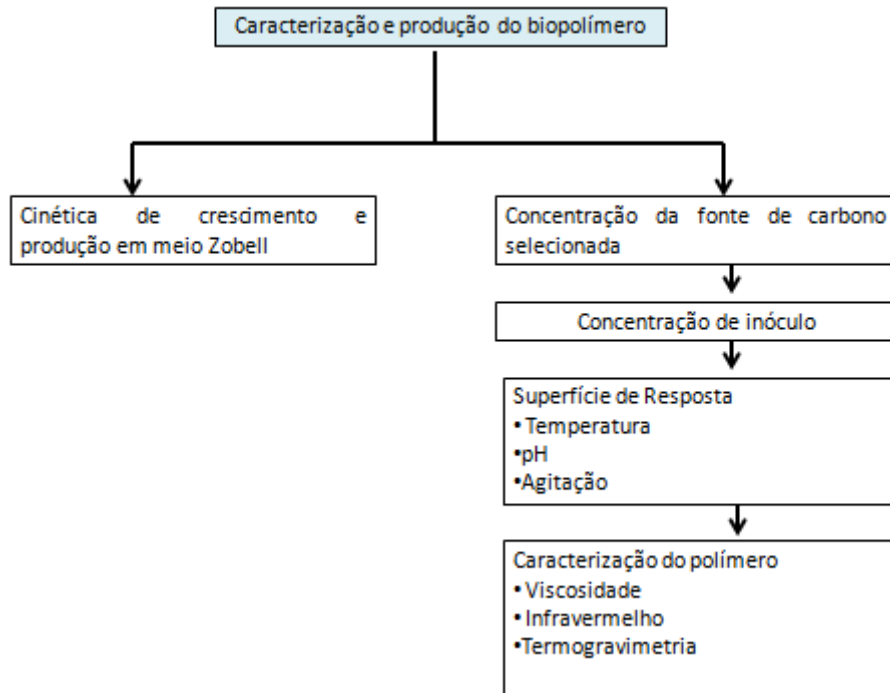


Figura 06- Fluxograma da 2ª etapa de experimentos adotados para a caracterização da produção do biopolímero.



4.1 CEPAS DO GÊNERO *Enterobacter* PRODUTORAS DE BIOPOLÍMERO

4.1.1 Sobre os micro-organismos

As bactérias utilizadas no presente estudo foram selecionadas da Coleção de Culturas de Micro-organismos do ICS - CCMICS pertencentes ao Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Micro-organismos – LABEM. Foram escolhidas duas cepas identificadas como sendo do Gênero *Enterobacter* CCMICS 544, CCMICS 549 a fim de selecionar a melhor produtora de biopolímero.

4.1.2 Caracterização macroscópica e microscópica

As cepas microbianas foram avaliadas morfológicamente e classificadas de acordo com aspectos macroscópicos (características coloniais em placa) e

microscópicos como morfologia e caracterização tintorial das células (coloração pela técnica de Gram).

4.1.3 Testes bioquímicos

As cepas bacteriana CCMICS 544 e CCMICS 549 foram testadas por uma batelada de provas bioquímicas, e identificadas por características do seu metabolismo, utilizando equipamento Microscan semi-automático e o Walkaway, ambos da Dade Bering, que consiste em painéis (microplacas) impregnados com séries bioquímicas para identificação bacteriana. O equipamento apresenta duas metodologias: colorimétrica e fluorimétrica. Utiliza o Software do LabPro versão 1.6.

4.2 TESTES PRELIMINARES E CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DE APENAS UMA CEPA PARA PROSSEGUIR COM OS TESTES DE PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS

As cepas foram testadas e comparadas segundo os seguintes critérios:

- (i) Desempenho em diferentes concentrações de fonte de carbono e NaCl;
- (ii) Desempenho em diferentes temperaturas e pH;
- (iii) Desempenho de crescimento e produção através da análise cinética de crescimento e produção de biopolímeros;
- (iv) Produção de biopolímero em diferentes fontes de carbono, para selecionar a melhor cepa produtora.

4.2.1 Testes preliminares com fonte de carbono e NaCl em diferentes faixas de temperatura e pH

Inicialmente as duas cepas foram testadas utilizando as condições operacionais de temperatura e pH, nas faixas entre 28 – 50°C e pH 3.0-9.0, respectivamente, em diferentes meios com diferentes concentrações de fonte de carbono (2,4,6%) e NaCl (1-5%) para avaliar o desempenho das cepas nestas condições. As

mesmas foram incubadas em estufas bacteriológicas, para monitoramento e controle da temperatura. O pH do meio de crescimento foi medido com pHmetro e ajustado com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico. O critério de avaliação foi o padrão de turbidez do crescimento bacteriano nas diferentes condições expostas.

4.2.2 Cinética de crescimento

As culturas foram incubadas em agitador orbital 120 rpm, a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 72 horas. O crescimento celular foi monitorado pela variação da Densidade Ótica (DO) em comprimento de onda de 560nm (espectrofotômetro Victor 3), e também por contagem em placa utilizando o meio Trypticase Soy Ágar- TSA com a metodologia adotada e descrita por Vermelho et al., (2007).

4.2.3 Produção de biopolímero em Meio Mínimo Mineral Marinho em diferentes fontes de carbono

Para selecionar a melhor cepa produtora e qual a melhor fonte de carbono, foi realizada a produção de biopolímero de acordo com o planejamento experimental exposto na Tabela 03. O meio utilizado para a produção foi o Meio Mínimo Mineral Marinho (baseado no meio Zobell) e a concentração adotada da fonte de carbono foi 2%. A glicerina não purificada (glicerina bruta) foi gentilmente cedida pelo Professor Ednildo Andrade Torres, coordenador do Laboratório de Energia e Gás - LEN da Escola Politécnica da UFBA.

Tabela 03- Diferente fontes de carbono testada com as cepas *Enterobacter* sp.

| CEPAS | SACAROSE | GLICEROL P.A | GLICOSE | GLICERINA BRUTA |
|------------|----------|-----------------|---------|--------------------|
| CCMICS 544 | 2% | 2% | 2% | 2% |
| CCMICS 549 | 2% | 2% | 2% | 2% |

4.2.4 Metodologias aplicadas para a produção do biopolímero

A metodologia utilizada para avaliar a capacidade das cepas *Enterobacter sp.* em produzir exopolissacarídeo foi adaptada ao modelo já utilizado pelos protocolos do LABEM e por García-Ochoa et al., (2000) e Druzian e Pagliarin (2007).

4.2.4.1 Preparação de pré-inóculo

Para a produção de célula inoculou 1000 µL de cultura *Enterobacter sp.* conservada em Hogness, em um erlenmeyer (com capacidade para 250 ml) contendo 50 ml do meio TSB. Os erlemeyers foram incubados em agitador orbital, *shaker* (Innova, New Brunswick 4080), com agitação de 120 rpm e mantidos a uma temperatura de $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 24 horas. Logo após as 24 horas, foi adicionado 1000 µL do “pré-inóculo” contendo *Enterobacter sp.*, em um erlenmeyer contendo 50 ml do meio TSA, incubado em um homogeinizador orbital por 24 horas, e a cepa selecionada por 12 horas (este tempo corresponde ao ótimo da fase log da cepa utilizada nos experimentos após a seleção, que corresponde a D.O_{560nm}, 2,2 com concentração celular em torno de 10^8 UFS/ mL), com temperatura à $28^{\circ}\text{C} + 2^{\circ}\text{C}$ à uma rotação de 120 rpm. A obtenção do pré-inóculo foi efetuada para posterior inóculo no meio de produção.

4.2.4.2 Preparação para produção do polímero

A produção do exopolissacarídeo sintetizado por *Enterobacter sp.* foi realizada em erlenmeyer com capacidade para 250 ml, contendo o meio de produção, a utilização da fonte de carbono foi de acordo com cada experimento realizado.

O meio de produção foi inoculado com 10% (v/v) do inóculo de *Enterobacter sp.* e incubado em agitador orbital. Com rotação de 180 rpm, a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 72 horas.

4.2.4.3 Preparação para a recuperação do polímero

Para a obtenção do polímero, após a fermentação por 72 horas o caldo foi centrifugado a 5500 rpm por 40 minutos a 4°C para remoção das células. Em seguida realizou o procedimento para a recuperação do polímero adicionando etanol na proporção (1:3, v/v), posteriormente armazenado sob-refrigeração a 4°C por 12 horas. Após a refrigeração o caldo contendo etanol foi centrifugado à 7.000 rpm por 30 minutos em temperatura de 4°C, o biopolímero precipitado foi seco em estufa a 50°C, até obtenção de peso constante.

4.2.5 Composição dos meios utilizados

Foram realizados testes de crescimento e produção de biopolímeros nos seguintes meios orgânicos:

- (i) TSB- Trypticase Soy Broth (meio comercial) é um meio nutritivo que favorece o crescimento de uma larga variedade de micro-organismos, incluindo bactérias aeróbias comuns, facultativas e anaeróbias e fungos. Sua composição consiste em: Caseína pancreática (17,0 g.L), Digerido de soja por papaína (3,0 g.L), Cloreto de sódio (5,0 g.L); Fosfato dipotássico (2,5 g.L); Dextrose (2,5 g.L).
- (ii) Meio Mínimo Mineral Marinho (baseado no meio Zobell, 1941) composto pelos seguintes reagentes (g.L): citrato de ferro(0,1 g.L), cloreto de sódio(19,45 g.L), cloreto de magnésio (8,8g/L), sulfato de sódio (3,24g.L), cloreto de cálcio(1,8g.L), cloreto de potássio (0,55g.L), bicarbonato de sódio (0,16g), ácido bórico (0,022g.L), nitrato de amônio(0,0016g.L), fosfato de sódio (0,008g.L), fluoreto de sódio(0,0024g.L), extrato de carne (0,001g.L), água destilada 1000 mL. Suplementada com fontes de carbono (glicerol, glicerina bruta e sacarose, cada uma em seus respectivos ensaios). Posteriormente o meio foi esterilizado por meio de vapor úmido (em autoclave) a temperatura de 121°C por um período de 15 minutos.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DA CEPA SELECIONADA ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO UTILIZANDO O GENE 16S rRNA

A cepa CCMICS 549 foi identificada através do sequenciamento do gene 16S rRNA. A extração do DNA foi feita utilizando o kit UltraClean® (MoBio) e o PCR do gene 16S rRNA foi feito utilizando o método e os primers universais descrito por Reysenbach et al., (2000). O resultado do PCR gerou um segmento de DNA de aproximadamente 1,5 kb que foi clonado em vetor TA-cloning (Invitrogen, Brazil) e o produto foi sequenciado pela “MWG DNA sequencing services”. As sequências foram checadas para presença de chimera e a árvore filogenética foi construída usando sequencias “tipo” do gene 16S rRNA bacteriano depositados em “Silva” – High Quality Ribosomal RNA Databases. As sequências foram alinhadas e analisadas pelo programa MEGA 4 usando o teste de bootstrap para 100 repetições com a técnica Neighbour-Joining gerado pelo algoritmo Kimura 2-parâmetros.

4.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO COM MEIO SINTÉTICO MARINHO

4.4.1 Cinética de crescimento com o Meio Mínimo Mineral Marinho

Para avaliar o desempenho da cepa *Enterobacter amnigenus* (cepa CCMICS 549) no Meio Mínimo Mineral Marinho no processo de fermentação, foi realizado previamente, três ensaios em diferentes condições de pré-inóculo:

- (i) A cepa foi ativada em meio TSB e posteriormente meio marinho;
- (ii) A cepa foi ativada em meio marinho e posteriormente em meio marinho
- (iii) A cepa foi ativada em TSB e posteriormente em TSB.

Estes ensaios foram realizados para verificar possíveis influências fisiológicas da cepa, a partir dos processos de pré-inóculo para posterior inóculo no meio de produção. De acordo com Pan et al., (2008), o pré-inóculo tem influência sobre a produção e a qualidade do polímero produzido, a concentração celular e as condições fisiológicas das células são fatores que interferem consideravelmente no processo de produção. O crescimento celular foi monitorado pela variação da Densidade Ótica (DO) em comprimento de onda de 560nm (espectrofotômetro Victor 3), e também por contagem em placa. O meio utilizado foi o Meio Mínimo Mineral Marinho suplementado com 2% de glicerol. As culturas foram incubadas em agitador orbital 120 rpm, a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 72 horas.

4.4.2 Cinética de produção

A cinética de produção foi realizada utilizando a *Enterobacter amnigenus* (cepa CCMICS 549) para verificar o seu desempenho na produção de polímero. O crescimento celular foi monitorado pela variação da Densidade Ótica (DO) em comprimento de onda de 560nm (espectrofotômetro Victor 3), e também por contagem em placa, a quantificação do biopolímero foi realizada com recuperação do polímero em pontos fixos da produção (0, 06, 12, 24, 36, 48, 60, 72 horas). O meio de produção foi Meio Mínimo Mineral Marinho suplementado com 2% de glicerol, com inóculo de 10% proveniente de uma cultura com (12 a 16 horas de incubação), posteriormente incubadas em agitador orbital 180 rpm, a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 72 horas.

4.4.3 Testes para avaliar a concentração de fonte de carbono e concentração de inóculo no meio de produção

Objetivando otimizar a produção de biopolímero, foram realizadas produções com diferentes concentrações de glicerol e diferentes concentrações de inóculo no meio de produção. As Tabelas 04 e 05 resumem o planejamento experimental das concentrações adotadas para concentração de fonte de carbono e

inóculo no meio de produção respectivamente. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Tabela 04- Planejamento experimental das concentrações de fonte de carbono.

| Fonte de Carbono | Concentrações | | | | |
|-------------------------|----------------------|----|----|----|----|
| Glicerol | 1% | 2% | 3% | 4% | 5% |

Tabela 05- Planejamento experimental das porcentagens da concentração do inoculo no meio de produção

| Variável | Porcentagens da variável | | |
|--------------------------------|---------------------------------|-----|-----|
| Concentração do Inóculo | 10% | 15% | 20% |

4.5 OTIMIZAR AS CONDIÇÕES OPERACIONAIS

4.5.1 Metodologia Superfície de Resposta (RSM)

Para avaliar as condições ideais de cultivo para a produção de EPS e otimização das condições operacionais, foi realizada a RSM, com base em três variáveis e cinco níveis (Tabela 06). Esta metodologia foi aplicada para saber a influência combinada dessas variáveis na produção do polímero. O planejamento consistiu em 17 ensaios com 3 pontos centrais, as interações das variáveis estão expostas na Tabela 07.

Tabela 06- Variáveis e níveis da Metodologia Superfície de Resposta.

| Variáveis | Níveis | | | | |
|--------------------|---------------|-----|-----|-----|-------|
| | -1,68 | -1 | 0 | 1 | 1,68 |
| Temperatura | 26,6 | 30 | 35 | 40 | 43,4 |
| pH | 5,32 | 6 | 7 | 8 | 8,68 |
| Rotação | 139,2 | 180 | 240 | 300 | 340,8 |

Tabela 07- Planejamento da Metodologia Superfície de Resposta.

| Ensaio | Temperatura (°C) | pH | Agitação (rpm) |
|---------------|-----------------------------|-----------|---------------------------|
| 01 | 30 | 6 | 180 |
| 02 | 40 | 6 | 180 |
| 03 | 30 | 8 | 180 |
| 04 | 40 | 8 | 180 |
| 05 | 30 | 6 | 300 |
| 06 | 40 | 6 | 300 |
| 07 | 30 | 8 | 300 |
| 08 | 40 | 8 | 300 |
| 09 | 26,6 | 7 | 240 |
| 10 | 43,4 | 7 | 240 |
| 11 | 35 | 5,32 | 240 |
| 12 | 35 | 8,68 | 240 |
| 13 | 35 | 7 | 139,2 |
| 14 | 35 | 7 | 340,8 |
| 15 | 35 | 7 | 240 |
| 16 | 35 | 7 | 240 |
| 17 | 35 | 7 | 240 |

Para controlar as variáveis na RSM, algumas medidas de controle foram adotadas.

4.5.1.1 Controle da temperatura

A temperatura foi avaliada e monitorada no processo de produção do exopolissacarídeo com variações da temperatura na faixa (26°C a 46°C) sendo controlada pelo equipamento homogeneizador orbital estufa com agitação (Innova, New Brunswick 4080).

4.5.1.2 Controle do pH

O pH inicial do meio de produção foi avaliado nas faixas 5.0 a 8.0 medido com pH metro com eletrodos convencionais de vidro da marca Thermo Electron, com leitura diretamente no meio de produção.

4.5.1.3 Controle da agitação

A velocidade de mistura por agitação orbital foi avaliada na faixa de (140-340) rpm, e controlada pelo equipamento homogeneizador orbital Innova, New Brunswick 4080.

4.5.2 Cinética de produção para validar otimização

A cinética de produção foi realizada com o objetivo de confirmar experimentalmente os resultados obtidos pela análise de superfície de resposta. Foi utilizada a cepa selecionada CCMICS 549, o crescimento celular foi monitorado pela variação da Densidade Ótica (DO) em comprimento de onda de 560nm (espectrofotômetro Victor 3), e também por contagem em placa. A quantificação do biopolímero foi realizada com recuperação do polímero em pontos específicos da produção. O meio de produção foi o Zobell suplementado com 3% de glicerol, com inóculo bacteriano de 10% proveniente de uma cultura com 12 a 16 horas de incubação, posteriormente incubadas em agitador orbital 240 rpm, $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 72 horas.

4.6 CARACTERIZAR AS PROPRIEDADES DO BIOPOLÍMERO PRODUZIDO

4.6.1 Testes de viscosidade

Foi realizada análise da viscosidade aparente utilizando o Reômetro Digital marca Brookfield, modelo LVDV III+, acoplado a um banho-maria, utilizando-se o adaptador para pequenas amostras, *spindle* 18, o que permite variar a taxa de cisalhamento de 0 a 264 s^{-1} e a viscosidade de 1,3 a 30000 cP. As leituras foram realizadas a intervalos de 10 segundos.

Para verificar o comportamento pseudoplástico do polímero produzido, foram preparadas soluções em diferentes porcentagens de concentrações (0,1; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%) e testadas em diferentes temperaturas (15, 25, 45, 65, 80°C) e em diferentes concentrações de NaCl (1% -5%). Para estas análises, foi utilizado biopolímero produzido nas condições de: Meio de fermentação Zobell, com 3% de glicerol, à temperatura de 35°C, pH 7.0 e rotação de 240 rpm.

O modelo de Oswald-de- Waele ($\mu = K (\dot{\gamma})^{n-1}$) foi utilizado para interpretar os dados de viscosidade, onde K é a constante de consistência, $\dot{\gamma}$ a taxa de cisalhamento e o “n” o index de fluidez.

4.6.2 Teste infravermelho

A amostra do biopolímero produzido pela *Enterobacter amnigenus* foi submetida à análise através da espectroscopia na região do infravermelho. A amostra do polímero foi tratada com brometo de potássio (KBr), preparadas em forma de pastilhas prensadas a vácuo e analisadas no espectrômetro Perkin Elmer Spectrum BX-II. A região de leitura compreendida em escala de medição 4000 cm^{-1} e 500 cm^{-1} .

4.6.3 Teste de termogravimetria

Para avaliar as propriedades térmicas do biopolímero produzido pela bactéria *Enterobacter amnigenus*, foi realizado análise termogravimétrica. A amostra foi analisada no equipamento Shimadzu TGA-50 em uma faixa de temperatura de 10 a 1000°C com taxa de aquecimento de 10°C/min sob vazão de nitrogênio 50 mL/min.

4.7 COMPARANDO PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO POR *Enterobacter amnigenus* COM MEIO DE PRODUÇÃO A BASE DE ÁGUA PRODUZIDA.

Para avaliar o desempenho da *Enterobacter amnigenus* em metabolizar água produzida, foi feita a produção de biopolímero com água produzida suplementada com os seguintes nutrientes KH_2PO_4 ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$); $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$); extrato de levedura ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$); $\text{C}_5\text{H}_8\text{NNaO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$) e como fonte de carbono sacarose e glicerina bruta, pasteurizado a 65°C por 30 minutos (Patente BR 10 2013 023075-8).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram tratados utilizando o programa *Statistic 7.0*, e as análises estatísticas foram aplicadas a variância ANOVA e ferramenta do Microsoft Excel 2010.

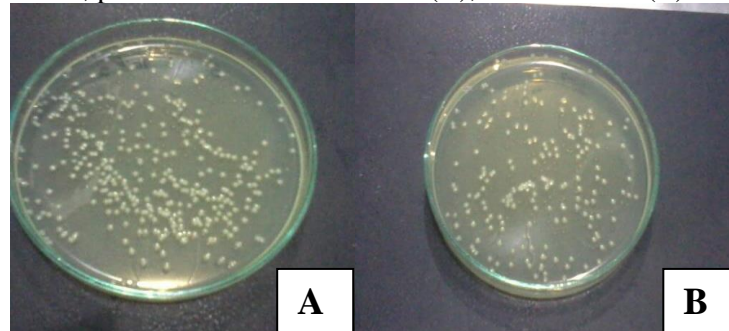
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CEPAS DO GÊNERO *Enterobacter* PRODUTORAS DE BIOPOLÍMERO

5.1.1 Aspectos macroscópicos e microscópicos

A identificação das cepas a partir da análise morfológica das colônias crescidas em meio TSA apresentaram características semelhantes, ambas estavam: viscosas, com aspecto brilhoso, cremosa e uniforme. A Figura 07 apresenta as imagens com as características das colônias.

Figura 07- Aspecto das colônias crescidas em meio TSA à 28°C $\pm 2^\circ\text{C}$, por 24 horas. CCMICS 544 (A), CCMICS 549 (B).



A partir da técnica de coloração de Gram a morfologia celular apresentaram as seguintes características morfológicas para ambas as cepas: Bacilos Gram-negativos curtos, isolados e aos pares.

5.1.2 provas bioquímicas

Os resultados das provas bioquímicas realizadas com as cepas testadas para produção de exopolissacarídeos estão resumidos na Tabela 08.

Tabela 08- Provas bioquímicas das cepas CCMICS 544 e CCMICS 549

| PROVAS BIOQUÍMICAS | CCMICS 544 | CCMICS 549 |
|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| Glicose | + | + |
| Sucrose | + | - |
| Sorbitol | + | + |
| Rafinose | + | ± |
| Ranminose | + | ± |
| Arabinose | - | - |
| Inositol | - | - |
| Adonitol | - | - |
| Melibiose | + | + |
| Ureia | - | - |
| H ₂ S | - | - |
| Indol | - | - |
| Lisina | - | - |
| Arginina | + | + |
| Ornitina | + | + |
| Triptofano desaminase | - | - |
| Esculina | - | - |
| Voges-Proskauer | + | + |
| Citrato | + | + |
| Malonato | + | + |
| Tartrato | - | + |
| Acetamida | + | - |
| o-Nitrofenil-β-D-Galactopiranosido | + | + |
| OF Glicose | + | + |
| Micro-organismos % | <i>E. cloacae</i> 99,9% | <i>Enterobacter</i> sp. 90,0% |

As análises realizadas em placas combo painel negativo (Figura 08) por automação (Microscan semi-automático) apresentaram resultados que indicaram uma similaridade bioquímica de 99,9% com *Enterobacter cloacae* para cepa CCMICS 544 e de 90,0 % com *Enterobacter* sp. para a cepa CCMICS 549. Ao analisar os resultados das provas bioquímicas da cepa CCMICS 549 observou que a sacarose, rafinose e ranminose não foram metabolizadas. A ranminose após 48 horas ficou positivo, e a rafinose não houve alterações. Comparando as provas bioquímicas realizadas com testes

realizados por Farmer em 1985 para avaliar as Enterobactérias, as bactérias que não oxidam sucrose e rafinose são as *Enterobacter amnigenus* biogrupo 2 e a *Enterobacter taylorae*. A espécie *Enterobacter amnigenus* pode ser dividida em dois biogrupos. Essas bactérias se diferem exatamente na metabolização dos açúcares, a *E. amnigenus* biogrupo 1 fermenta sacarose e rafinose, mas não o sorbitol, enquanto que a *E. amnigenus* biogrupo 2 fermenta sorbitol mas não a sacarose e ou rafinose. Esses dados podem ser conferidos na tabela de diferenciação do gênero *Enterobacter* elaborado por Farmer, (1985) (ANEXO A) Atualmente são reconhecidas 19 espécie pertencentes ao gênero *Enterobacter* tornando-se uns dos maiores da família Enterobacteriaceae. A Identificação fenotípica e quimiotaxonômica são difíceis para o gênero *Enterobacter* devido ao alto grau de homoplasia bem como a natureza polifilética do gênero. As bactérias *E. amnigenus* e *E. nimipressuralis*, podem ser diferenciados de outras bactérias do gênero *Enterobacter* devido a sua incapacidade de oxidar tweens 40 e 80, D - arabitol, m - inositol (BRADY et al., 2013).

Figura 08 - Microplacas combo painel negativo para análise de provas bioquímicas.



5.2 TESTES PRELIMINARES PARA SELEÇÃO DA CEPA PRODUTORA DE BIOPOLÍMERO

5.2.1 Testes preliminares com fonte de carbono e NaCl em diferentes faixas de temperatura e pH

Avaliando o desempenho das cepas CCMICS 544 e CCMICS 549 os testes preliminares realizados com variações nas concentrações de fonte de carbono e de NaCl e em diferentes temperaturas e pH, mostraram que ambas as cepas apresentaram os mesmos desempenhos em todos os parâmetros exceto na concentração de NaCl, na qual a cepa CCMICS 549 mostrou-se mais tolerante as concentrações mais altas de NaCl, crescendo em meio de cultura com uma concentração de 3.5% de sal. Os resultados estão resumidos na Tabela 09.

Prasertsan et al., (2008), em seu trabalho de otimização de produção de biopolímero por *Enterobacter cloacae*, avaliaram diferentes concentrações e fontes de carbono e diferentes faixas de pH e temperatura e reportaram que a cepa sintetizava biopolímero nas diferentes condições testadas; no entanto, as condições ótimas de operação foram com sacarose em concentração de 3%, na temperatura de 30°C e pH 7,0. Comparando os resultados dos testes preliminares, observa-se que as duas cepas do gênero *Enterobacter* crescem em uma faixa ampla de temperatura (25 a 40°C), pH próximo a neutralidade, mas, com diferentes concentrações da fonte de carbono. O fato da cepa CCMICS 549 tolerar maior concentração de NaCl é favorável para sua utilização na metabolização de resíduos que possam ter altas concentrações de sal. Estudos realizados por Hua et al., (2010) mostram que uma cepa de *Enterobacter cloacae* consegue produzir EPS metabolizando hidrocarbonetos em altas concentrações de sal quando em consórcio com *Cunninghamella echinulata*.

Tabela 09- Desempenho das cepas CCMICS 544 e CCMICS 549.

| Testes | | CCMICS 544 | CCMICS 549 |
|-------------|------|------------|------------|
| GLICOSE | 2% | + | + |
| | 4% | + | + |
| | 6% | + | + |
| NaCl | 1% | + | + |
| | 1.5% | + | + |
| | 2.0% | + | + |
| | 2.5% | - | + |
| | 3.0% | - | + |
| | 3.5% | - | + |
| | 4.0% | - | - |
| | 4.5% | - | - |
| | 5.0% | - | - |
| TEMPERATURA | 25°C | + | + |
| | 30°C | + | + |
| | 35°C | + | + |
| | 40°C | + | + |
| | 45°C | - | - |
| | 50°C | - | - |
| pH | 3.0 | - | - |
| | 4.0 | - | - |
| | 5.0 | - | - |
| | 6.0 | + | + |
| | 7.0 | + | + |
| | 8.0 | + | + |
| | 9.0 | - | - |

5.2.2 Cinética de crescimento

Curvas de crescimento foram realizadas com as cepas CCMICS 544 e CCMICS 549 com a finalidade de caracterizar a fase exponencial de crescimento. A concentração celular foi aferida utilizando densidade ótica (560nm) e contagem em placa no final de cada tempo estabelecido da cinética.

A partir das curvas (Figuras 09 e 10) observou-se que a cepa CCMICS 544 mostrou uma maior cinética de crescimento alcançando a fase estacionária em torno de 32 horas, com concentração celular média de 10^9 UFC.mL⁻¹. A cepa CCMICS 549

alcançou a fase estacionária em torno de 12 horas com concentração celular média 10^8 UFC.mL⁻¹.

Figura 09- Curva de crescimento bacteriano da CCMICS 544.

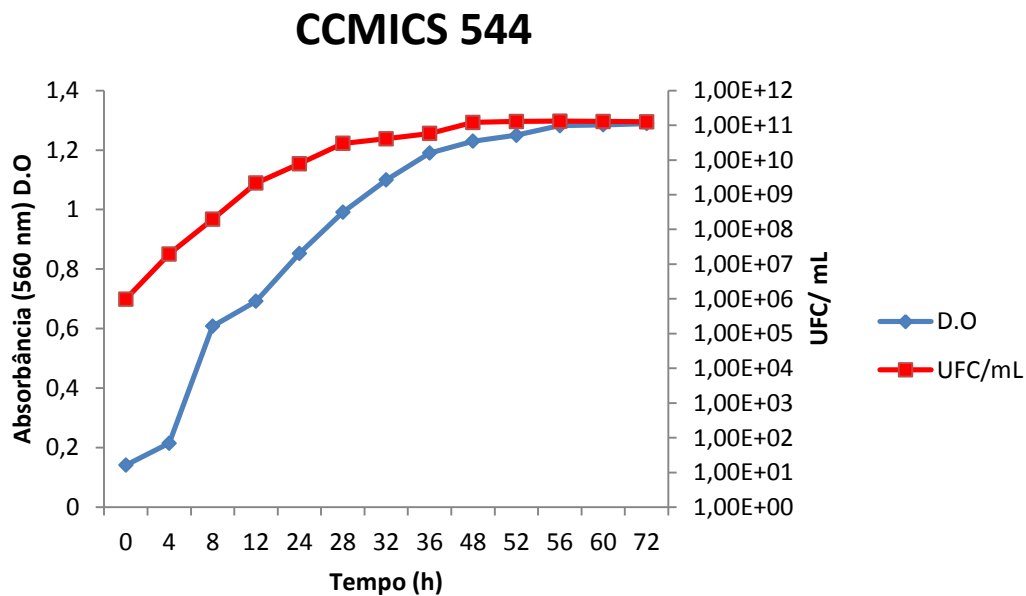
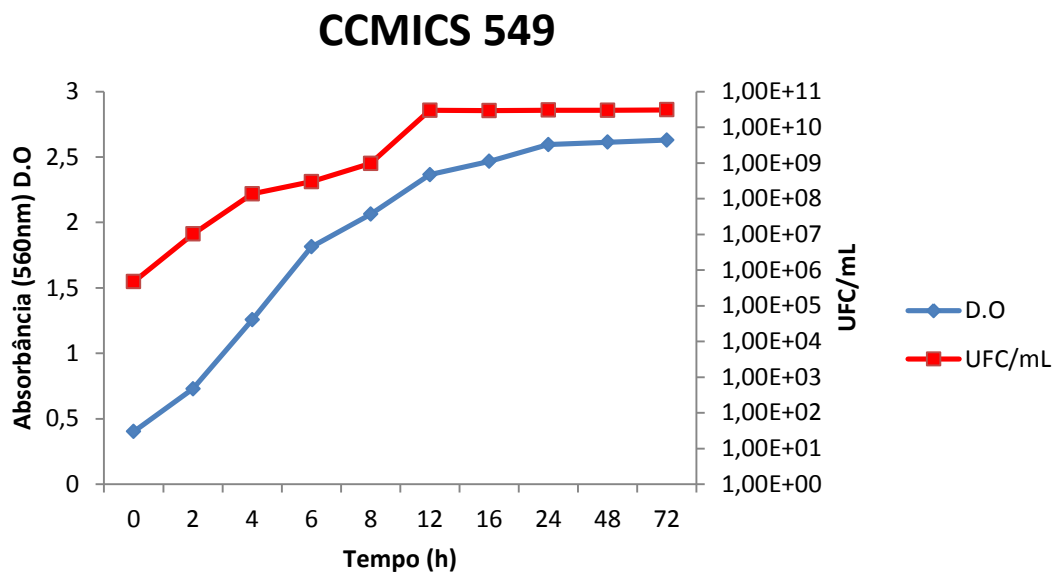


Figura 10 - Curva de crescimento bacteriano da CCMICS 549.



5.2.3 Produção de biopolímero em Meio Mínimo Mineral Marinho com diferentes fontes de carbono

Utilizando as cepas CCMICS 544 e CCMICS 549 foram realizados ensaios de produção de biopolímero utilizando diferentes fontes de carbono (Sacarose, Glicose, Glicerol, Glicerina Bruta) em meio marinho sintético.

Como a meta desse trabalho foi a de desenvolver um meio de produção de biopolímero bacteriano, que utilizasse a água produzida salina de campos maduros, optou-se por utilizar um meio mineral que simulasse a composição da água do mar. Compreende-se que a água produzida salina de campos maduros já apresenta uma concentração de sais igual ou semelhante a água do mar. Caso a concentração de sais da água produzida seja um pouco menor que a concentração da água do mar, o que pode acontecer nessas circunstâncias, ficaria fácil corrigir esse fator com a adição de sais ao invés de ter que retirá-los, caso o meio de produção não se assemelhasse às condições marinhas. O meio mineral marinho, portanto, foi elaborado segundo o meio Zobell, pois este se assemelha mais à água do mar em sua composição. O resultado da produção de EPS pelas cepas CCMICS 544 e CCMICS 549 nessas condições foram resumidos na tabela 10.

Tabela 10 - Análise da produção de EPS CCMICS 544 e 549 em diferentes fontes de carbono.

| CEPAS | SACAROSE 2% | GLICEROL 2% | GLICOSE 2% | GLICERINA BRUTA 2% |
|--|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| CCMICS 544 EPS (g.L⁻¹) | 2,835 | 2,9925 | 3,947 | 3,275 |
| CCMICS 549 EPS (g.L⁻¹) | 0,868 | 4,740 | 3,044 | 3,841 |

Avaliando a capacidade das cepas CCMICS 544 e CCMICS 549 em metabolizar as fontes de carbono sacarose, glicerol, glicose e glicerina bruta. Foi observado que a cepa CCMICS 544 obteve melhor resultado utilizando a glicose como fonte de carbono com produção de 3,947 g.L⁻¹ de polímero. A Cepa CCMICS 549 apresentou melhor desempenho utilizando o glicerol como fonte de carbono com

produção de 4,740 g.L⁻¹ de polímero, porém quando utilizou a sacarose como fonte de carbono, houve uma queda na produção que ficou com 0,868 g.L⁻¹ de polímero. Este rendimento está relacionado com a incapacidade da cepa CCMICS 549 em utilizar a sacarose como fonte de carbono (Tabela 08).

Ao compararmos os resultados entre as duas cepas, a CCMICS 549 apresentou melhor desempenho utilizando resíduos como o glicerol e a glicerina bruta (glicerina não purificada) com produção de 4,740 g.L⁻¹ e 3,841 g.L⁻¹ respectivamente. Freitas et al., (2011^b) reporta uma produção de 8,1g.L⁻¹ com cepa do gênero *Enterobacter* utilizando 2% de glicerol em meio ME*, mas que não apresenta as mesmas condições salinas acima citadas.

Ao avaliar as cepas CCMICS 544 e CCMICS 549, para selecionar a cepa com melhor desempenho para produzir biopolímero, a cepa CCMICS 549 foi a que apresentou melhores resultados nos testes preliminares, pois é capaz de em metabolizar concentrações mais altas de sal, bem como o seu comportamento na cinética de crescimento, que alcançou fase estacionária em 12 horas após a inoculação, o que favorece a otimização do processo de produção.

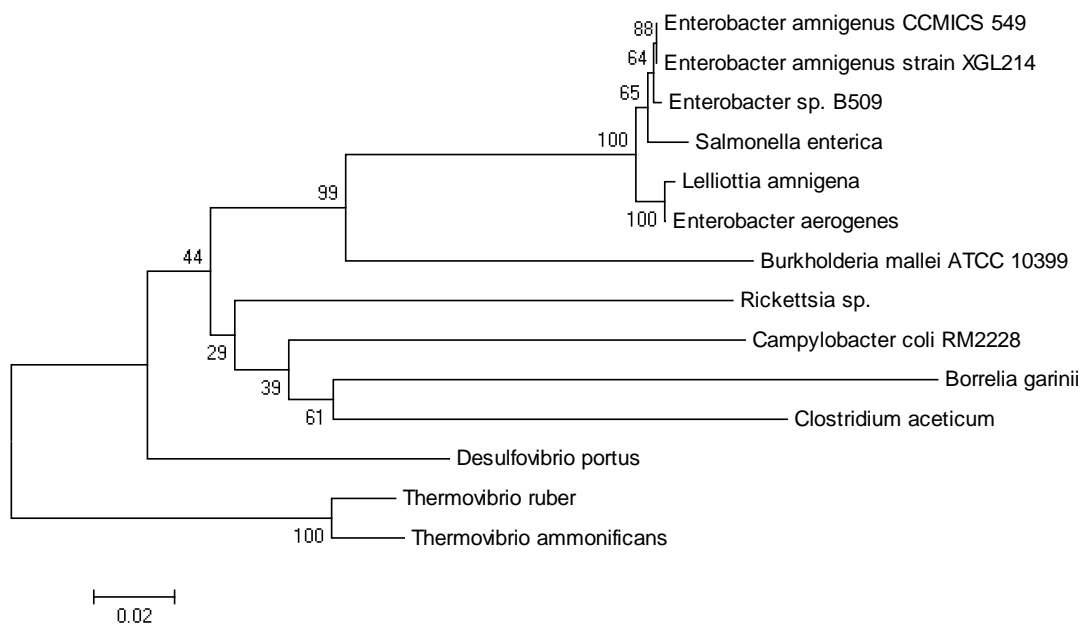
5.3 IDENTIFICAÇÃO DA CEPA SELECIONADA ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO UTILIZANDO O GENE 16S rRNA

A identidade da sequência do 16S rRNA obtido a partir da cepa CCMICS 549 foi testada em análise filogenética comparando com micro-organismos “tipo” depositados no site “Silva – High Quality Ribosomal RNA Databases” (Figura 11). O resultado identifica a cepa como sendo *Enterobacter amnigenus*. Os testes bioquímicos (tabela 08) ampliam essa identificação genética para *Enterobacter amnigenus* biogrupo 2 segundo Farmer et al., (1985) que testa a capacidade da cepa em metabolizar diferentes tipos de açúcares.

As bactérias do gênero *Enterobacter*, são bacilos Gram-negativos amplamente distribuídos na natureza e são encontrados no solo, na água, em vegetais e no trato digestivo de humanos e animais (KONEMAN et al., 2010). Atualmente 19 espécies conhecidas compõem o gênero *Enterobacter* exceto a *Enterobacter aerogenes*,

tornando-se um dos maiores gêneros da família *Enterobacteriaceae* (BRADY et al., 2013).

Figura 11 - Análise filogenética da cepa CCMIS549. A árvore filogenética foi construída usando neighbour-Joining e Kimura 2-parametros com bootstraps de 100 repetições em evidência na árvore.



5.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO COM MEIO SINTÉTICO MARINHO

5.4.1 Cinética de crescimento com meio de produção

Utilizando a bactéria *Enterobacter amnigenus*, foram realizados três ensaios para avaliar os efeitos fisiológicos que precedem a produção do polímero. Nas figuras 12 e 13 estão representados os resultados obtidos. Os ensaios correspondem:

Teste 01 - A cepa foi ativada em meio TSB e posteriormente meio marinho;

Teste 02 - A cepa foi ativada em meio marinho e posteriormente em meio marinho;

Teste 03 - A cepa foi ativada em TSB e posteriormente em TSB.

Figura 12 - Comportamento do crescimento da *Enterobacter amnigenus*

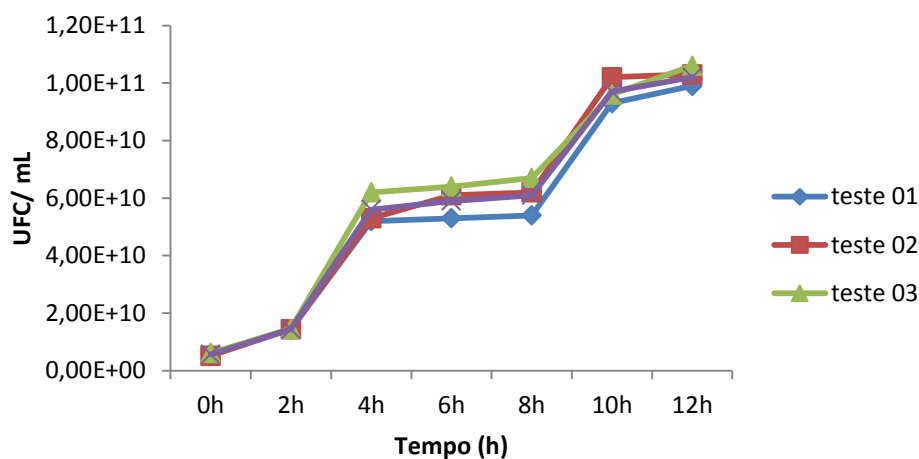
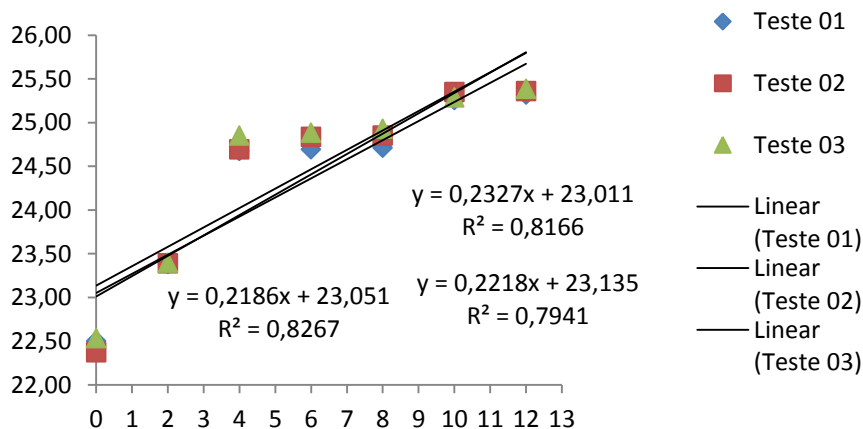


Figura 13 - LN do crescimento da *Enterobacter amnigenus*



A partir dos resultados obtidos observou-se que não houve variações na cinética de crescimento nas três condições analisadas para a preparação de inóculo (Figuras 12 e 13). Portanto, as condições de preparação de pré-inóculo não influenciaram no crescimento celular em meio de produção suplementado com glicerol como única fonte de carbono.

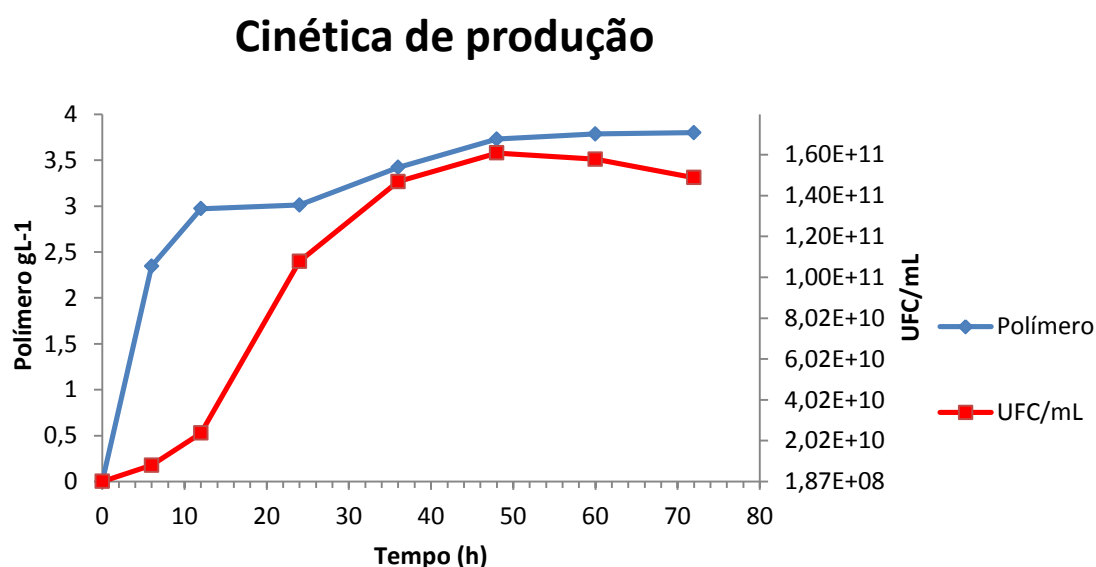
A análise da cinética de crescimento mostrada na Figura 12 evidencia um crescimento dióxico causado pela composição do meio. De acordo com literatura, o

crescimento dióxico está associado a utilização de diferentes fontes de carbono durante o crescimento bacteriano. No entanto, nesse experimento, foi utilizado apenas uma única fonte de carbono, o que, a princípio, levantou suspeitas sobre o grau de pureza dessa substância. Por outro lado, esse efeito dióxico no crescimento de *Enterobacter* foi também reportado por Garcia-Ochoa et al., (2000) e Jitrwung et al., (2013). Os autores sugeriram que esse efeito está relacionado com a utilização de diferentes fontes de nitrogênio no meio, o que explicaria esse fenômeno no teste realizado nesse trabalho. Portanto, acredita-se que esse efeito dióxico não se trata da utilização em sequência de diferentes fontes de carbono e/ou do efeito da preparação do inóculo como reportado por Narang et al., (1997), e sim, pela utilização de diferentes fontes de nitrogênio quando a *Enterobacter* cresce em meio com uma única fonte de carbono.

5.4.2 Cinética de produção

A cepa *Enterobacter amnigenus* foi submetida a análise de produção de biopolímero em Meio Mínimo Mineral Marinho suplementado com glicerol como única fonte de carbono, para avaliar o seu desempenho no processo de produção. Na figura 14 está representada a produção de biopolímero por *Enterobacter amnigenus*.

Figura 14 - Cinética de produção de biopolímero por *Enterobacter amnigenus*.



Em 72 horas a produção de biopolímero em Meio Mínimo Mineral Marinho pela cepa *Enterobacter amnigenus* atingiu uma produção máxima de 3.80 g.L^{-1} alcançando o ótimo de produção na fase estacionária. A cinética de produção é semelhante a obtida por Moitinho (2012), que desenvolveu trabalhos com cepas de *Xantomonas arborícola* e *Enterobacter cloacae* e ambas mantiveram o máximo de produção na fase estacionária com produção de polímero em $5,86 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,9 \text{ g.L}^{-1}$ respectivamente. A cinética de produção demonstrou que com 12 horas de fermentação houve um aumento significativo da produção do polímero, e que este se manteve até as 24 horas de incubação. Observa-se um ligeiro aumento a partir das 36 horas até as 72 horas de fermentação.

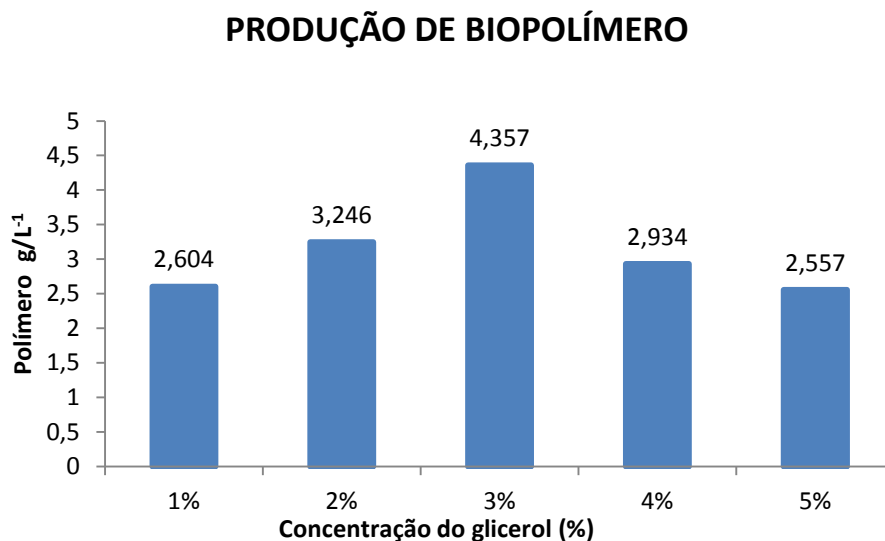
5.4.3 Concentração da fonte de carbono e concentração do inóculo celular

- Concentração de carbono

A otimização do meio de fermentação é uma das condições necessárias para um melhor desempenho no processo de produção de EPS. Visando otimizar a concentração ideal de glicerol para o processo fermentativo com *Enterobacter amnigenus*, foi feito ensaios variando as concentrações a partir de 1-5% no meio de produção.

Em análise dos ensaios realizados com as diferentes concentrações do glicerol, a concentração de 3% foi a que mais favoreceu a produção de biopolímero, com produção máxima de $4,357 \text{ g.L}^{-1}$. Os resultados obtidos dos processos fermentativos estão representados na Figura 15.

Figura 15 - Gráfico da produção de biopolímero em diferentes concentrações de glicerol.



De acordo com Garcia-Ochoa et al., (2000) e Mesomo (2007), a concentração da fonte de carbono no meio de fermentação fica em torno de 2-4%. Em estudos realizados por Prasertsan et al., (2008), otimizando a produção de biopolímero por *Enterobacter*, um dos fatores de avaliação foi a fonte de carbono e a concentração no meio de produção, obtendo como ótimo no processo fermentativo a concentração de 3% de sacarose com produção de polímero 2,22 g.L⁻¹ do polímero. Ao compararmos os resultados produzidos por Prasertsan et al., (2008), que foi de 2,22 g/L⁻¹ com os obtidos nos ensaios deste trabalho (4,357 g.L⁻¹), foi possível observar que houve uma maior produção nas condições utilizando o glicerol como fonte de carbono.

No tratamento estatístico utilizando análise de variância ANOVA observa-se que tem diferença significativa em relação as concentrações analisadas, e que a concentração a 3% foi a que teve maior significância em relação as demais. Na tabela 11 estão representados os resultados dos tratamentos estatísticos.

Tabela 11 - Análise de variância ANOVA, concentração de fonte de carbono.

| Grupo | Contagem | Soma | Média | Variância |
|--------------|-----------------|-------------|--------------|------------------|
| 1% | 3 | 7,812 | 2,604 | 0,553216 |
| 2% | 3 | 9,74 | 3,246667 | 0,009317 |
| 3% | 3 | 13,072 | 4,357333 | 0,379525 |
| 4% | 3 | 8,804 | 2,934667 | 0,046117 |
| 5% | 3 | 7,672 | 2,557333 | 0,044197 |

A NOVA

| Fonte da variação | SQ | gl | MQ | F | valor-P | F crítico |
|--------------------------|-----------------|-----------|-----------|----------|----------------|------------------|
| Entre grupos | 6,486709 | 4 | 1,621677 | 7,854123 | 0,003933 | 3,47805 |
| Dentro dos grupos | 2,064747 | 10 | 0,206475 | | | |
| Total | 8,551456 | 14 | | | | |

- Concentração do inóculo celular

O volume inicial da concentração celular no meio de fermentação influencia na produção e qualidade do EPS produzido. Ensaios com diferentes concentrações de inóculo foram realizados, com o objetivo de otimizar a concentração inicial do inóculo na produção de EPS a partir da cepa *Enterobacter amnigenus*. As Tabelas 12 e 13 mostram os resultados das concentrações 10%, 15% e 20%, e os dados estatísticos utilizando análise de variância ANOVA.

Tabela 12 - Média e variância da concentração de inóculo.

| Grupo | Contagem | Soma | Média | Variância |
|-------|----------|--------|-------|-----------|
| 10% | 3 | 13,92 | 4,640 | 0,043888 |
| 15% | 3 | 14,964 | 4,988 | 0,372528 |
| 20% | 3 | 12,68 | 4,226 | 0,022885 |

Tabela 13- Análise da relação entre as concentrações de inóculo.

| Fonte da variação | SQ | gl | MQ | F | valor-P | F crítico |
|-------------------|---------|----|----------|-------|---------|-----------|
| Entre grupos | 0,87157 | 2 | 0,435788 | 2,976 | 0,1265 | 5,1432 |
| Dentro dos grupos | 0,87860 | 6 | 0,146433 | | | |
| Total | 1,75018 | 8 | | | | |

Analisando a média dos ensaios na tabela 14, observa-se que a maior produtividade está associada com a concentração de 15% de inóculo, no entanto não existe diferença estatística significativa entre elas. De acordo com Garcia-Ochoa et al., (2000), o volume ideal de inóculo para caldo de fermentação para a produção de EPS é de 5 a 10% do volume total do meio de produção. A relação entre o crescimento bacteriano e a produção do polímero está relacionada com a disponibilidade da fonte de carbono no meio de produção. Portanto a concentração de inóculo inicial no meio de produção deve adequar-se as condições utilizadas para a produção de biopolímero e o comportamento apresentado pelo micro-organismo.

Sendo assim o inóculo inicial ideal para produção de EPS com *Enterobacter amnigenus*, para este trabalho foi a concentração de 10% já que um dos objetivos é a redução de custo final no processo de produção.

5.5 OTIMIZANDO AS CONDIÇÕES OPERACIONAIS

5.5.1 Metodologia Superfície de Resposta (RSM)

Os testes preliminares mostraram que alguns fatores físicos como temperatura e pH podem influenciar no crescimento celular e conseqüentemente interferir na produção de EPS. A Metodologia de Superfície de Resposta foi, portanto, aplicada com o propósito de definir as melhores condições para produção de biopolímero.

Na tabela 14 estão dispostos os dados da matriz das variáveis juntamente com os valores de resposta de produção de EPS.

Tabela 14 - Matriz experimental das variáveis.

| TESTES | TEMPERATURA | pH | Rotação | Polímero gL ⁻¹ (*) |
|-----------|-------------|------|---------|-------------------------------|
| Teste 01 | 30 | 6 | 180 | 3,08 |
| Teste 02 | 40 | 6 | 180 | 2,42 |
| Teste 03 | 30 | 8 | 180 | 3,28 |
| Teste 04 | 40 | 8 | 180 | 2,19 |
| Teste 05 | 30 | 6 | 300 | 2,80 |
| Teste 06 | 40 | 6 | 300 | 3,56 |
| Teste 07 | 30 | 8 | 300 | 2,92 |
| Teste 08 | 40 | 8 | 300 | 3,68 |
| Teste 09 | 26,6 | 7 | 240 | 3,40 |
| Teste 10 | 43,4 | 7 | 240 | 2,62 |
| Teste 11 | 35 | 5,32 | 240 | 3,13 |
| Teste 12 | 35 | 8,68 | 240 | 2,96 |
| Teste 13 | 35 | 7 | 139,2 | 2,54 |
| Teste 14 | 35 | 7 | 340,8 | 2,90 |
| *Teste 15 | 35 | 7 | 240 | 4,70 |
| *Teste 16 | 35 | 7 | 240 | 4,59 |
| *Teste 17 | 35 | 7 | 240 | 4,88 |

Ponto central *

Foi observado que as variações na produção de EPS dependem da combinação de temperatura, pH e rotação utilizadas. Os resultados para o ponto central (teste 15, 16 e 17) corresponde a temperatura 35°C, pH 7,0 e agitação de 240 rpm com a produção de polímero entre 4,59 a 4,88 g.L⁻¹. Os testes 09 e 10 da matriz experimental mostram que a temperatura tem significativa influência na produção do polímero. A temperatura mais elevada (43,4°C) diminuiu significativamente a produção (2,62 g.L⁻¹). Estes valores concordam com o reportado por Torres et al., (2012), que teve as temperaturas extremas influenciando na produção de polímeros, com a temperatura em 44,1°C influenciando no crescimento celular e consequentemente reduzindo a produção de polímero de 7,00 para 1,12 g.L⁻¹.

A significância estatística para a superfície de resposta foi calculada através da análise de variância ANOVA, modelo polinomial quadrático. A análise de variância mostrou que a significância entre as variáveis o valor de p é menor p < 0,05, e que o valor de lack off 0,107853 não foi significativo indicando, portanto, que o modelo foi adequado para prever o rendimento de EPS sob as variáveis testadas, com coeficiente de determinação 0,90009 mostrando concordância entre os valores experimentais com o previsto pelo modelo polinomial. Estes dados estão representados na Tabela 15.

Tabela 15- ANOVA, modelo polinomial quadrático.

| ANOVA; Var.:Produção gL; R-sqr=,90009; Adj:,77163 (2**(3) central composite, 1 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Pure Error=,0225831 DV: Produção gL | | | | | |
|---|----------------|----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Factor | SS | df | MS | F | p |
| (1)Temperatura(L) | 0,03460 | 1 | 0,034601 | 1,5322 | 0,341386 |
| Temperatura(Q) | 3,61916 | 1 | 3,619157 | 160,2594 | 0,006182 |
| (2)pH (L) | 0,00018 | 1 | 0,000177 | 0,0079 | 0,937468 |
| pH (Q) | 3,47017 | 1 | 3,470168 | 153,6621 | 0,006445 |
| (3)Rotação (L) | 0,01009 | 1 | 0,010091 | 0,4469 | 0,572655 |
| Rotação (Q) | 5,05110 | 1 | 5,051098 | 223,6671 | 0,004441 |
| 1L by 2L | 0,00934 | 1 | 0,009339 | 0,4135 | 0,586068 |
| 1L by 3L | 1,33934 | 1 | 1,339339 | 59,3071 | 0,016447 |
| 2L by 3L | 0,02233 | 1 | 0,022331 | 0,9888 | 0,424811 |
| Lack of Fit | 0,96699 | 5 | 0,193399 | 8,5639 | 0,107853 |
| Pure Error | 0,04517 | 2 | 0,022583 | | |
| Total SS | 10,13036 | 16 | | | |

Os gráficos tridimensionais apresentam configurações a cada dois fatores (variáveis) testados. Figuras 16, 17 e 18.

Avaliando o gráfico representado na figura 16, observa-se que as faixas de melhor produtividade de EPS, em relação pH e temperatura está no ponto central que corresponde com 7,0 e 35°C respectivamente. Com produção de EPS > 4,0 0 g.L⁻¹.

A relação da temperatura com a rotação, representado na figura 17 permite visualizar que estas variáveis proporcionam melhor produção de EPS quando estão nas faixas próximas ao ponto central 35°C e 240 rpm respectivamente, com produção de EPS > 4,0 0 g.L⁻¹.

Figura 16- Cinética da produção de EPS em relação a temperatura e pH.

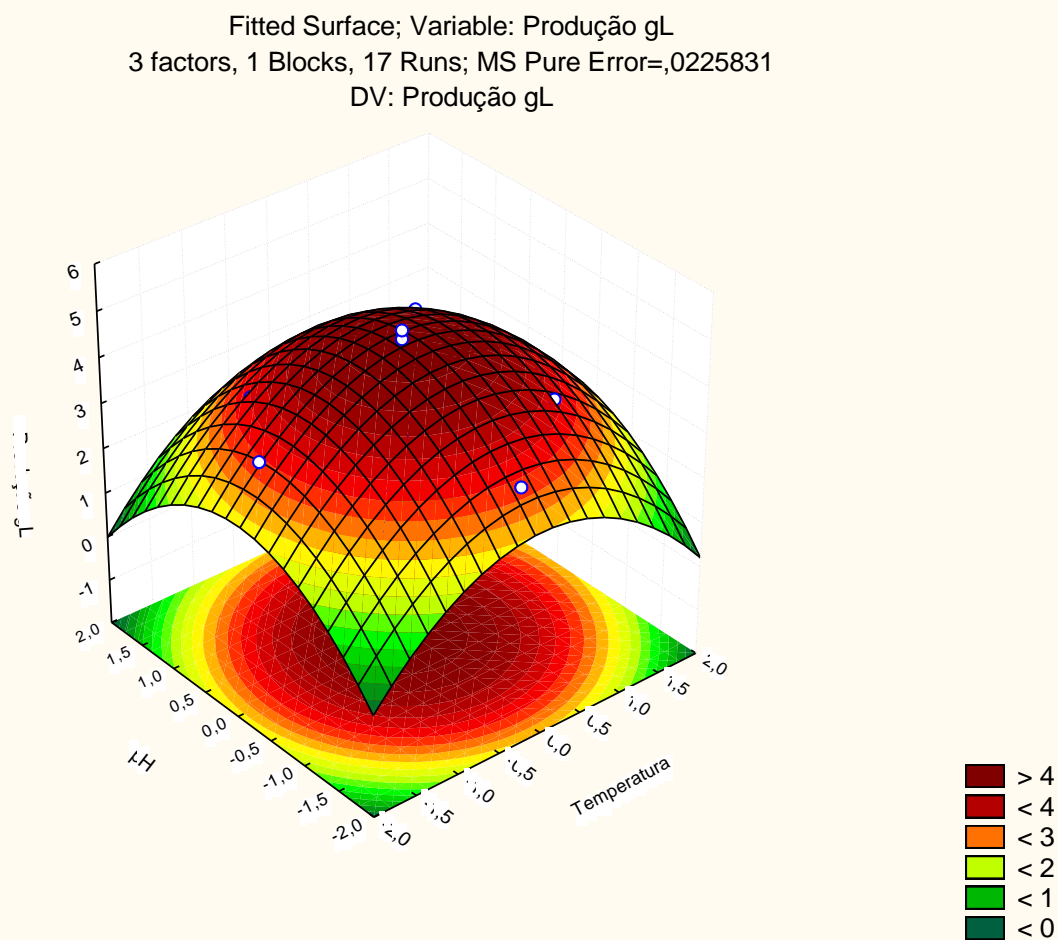
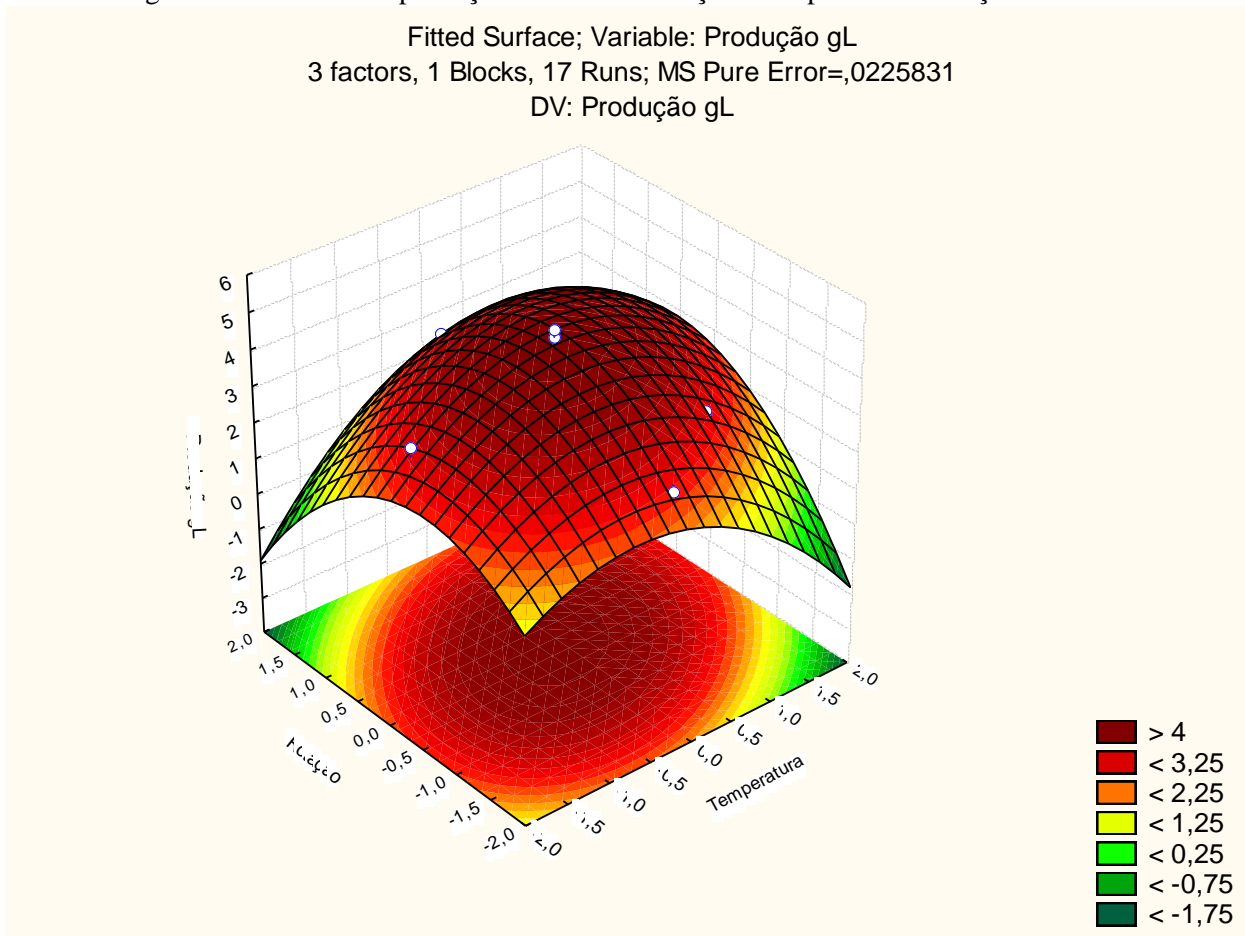


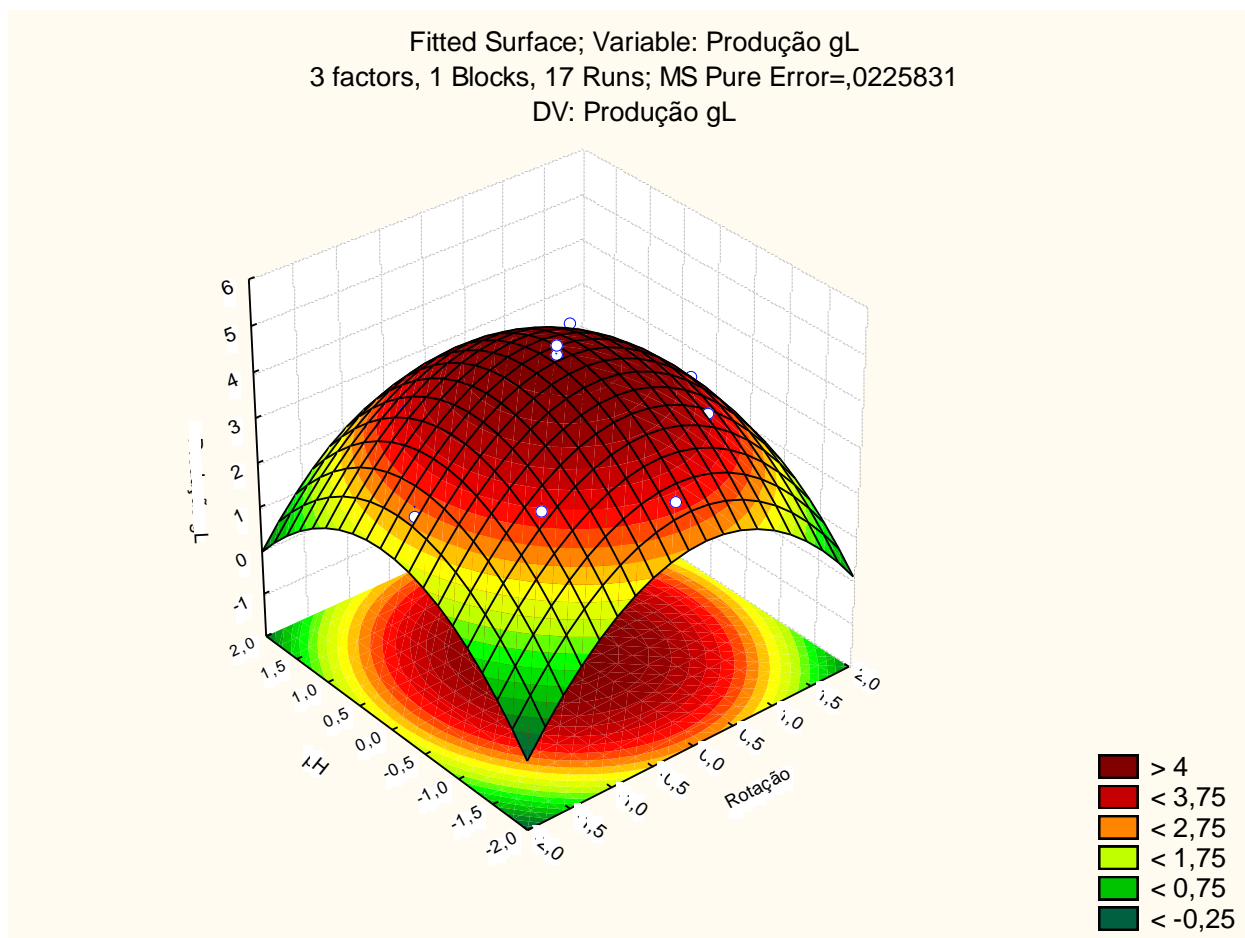
Figura 17 - Cinética da produção de EPS em relação a temperatura e rotação.



Avaliando a relação pH e rotação na produção de EPS, observa-se que a melhor produção encontra-se nas faixas das variáveis próximas ao ponto central pH 7,0 e rotação 240 rpm, e que essa produção é $> 4,0 \text{ g.L}^{-1}$, estes dados estão representados no gráfico da figura 18.

Os gráficos construídos a partir dos resultados obtidos da Metodologia Superfície de Resposta permitiu visualizar que, os fatores operacionais têm influência no processo de produção de EPS. E que a otimização desses fatores é necessário para melhor produção dos produtos requeridos a partir *Enterobacter amnigenus*. As variáveis como pH, rotação e temperatura, proporcionaram melhor produção nas faixas próximas ao ponto central que corresponde a pH 7,0; temperatura 35°C e rotação 240 rpm. A produção nestas condições de variáveis produziram EPS entre 4,59 a 4,88 g.L^{-1} . Estes valores estão representados na tabela 14, nos testes 15,16 e 17 respectivamente.

Figura 18 – Cinética da produção de EPS em relação ao pH e rotação.



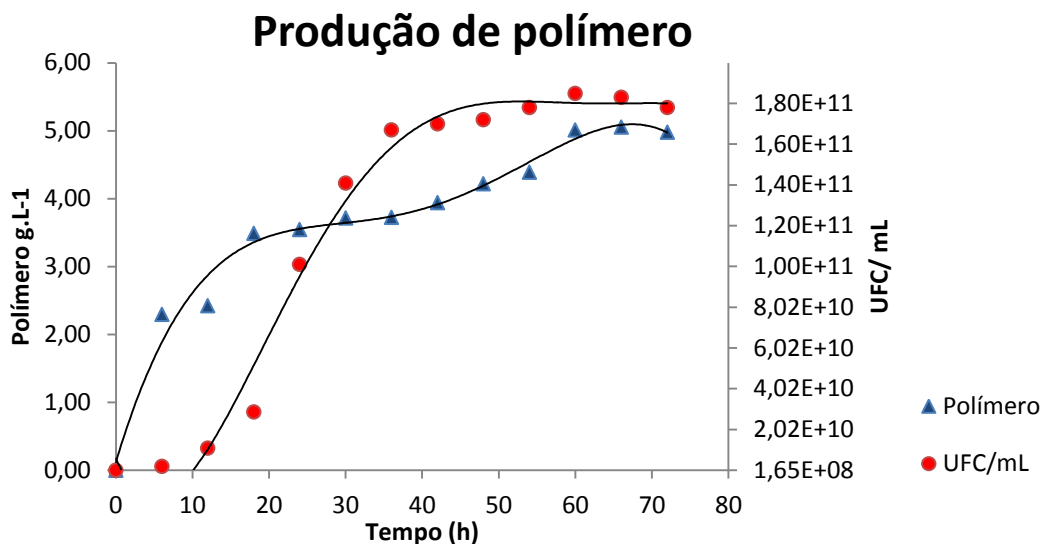
5.5.2 Cinética de produção (validação experimental)

Foram realizados ensaios de produção de biopolímero utilizando a bactéria *Enterobacter amnigenus*, nas condições otimizadas pela Metodologia Superfície de Resposta. As variáveis otimizadas foram: Temperatura 35°C, pH 7,0 e rotação 240 rpm. Este ensaio serviu para validar as condições operacionais obtidas pelo (RSM), utilizando o Meio Mínimo Mineral Marinho suplementado com 3% de glicerol como única fonte de carbono.

Ao avaliar os resultados representados na figura 19 observou que a *Enterobacter amnigenus*, sintetizou o biopolímero nas condições otimizadas,

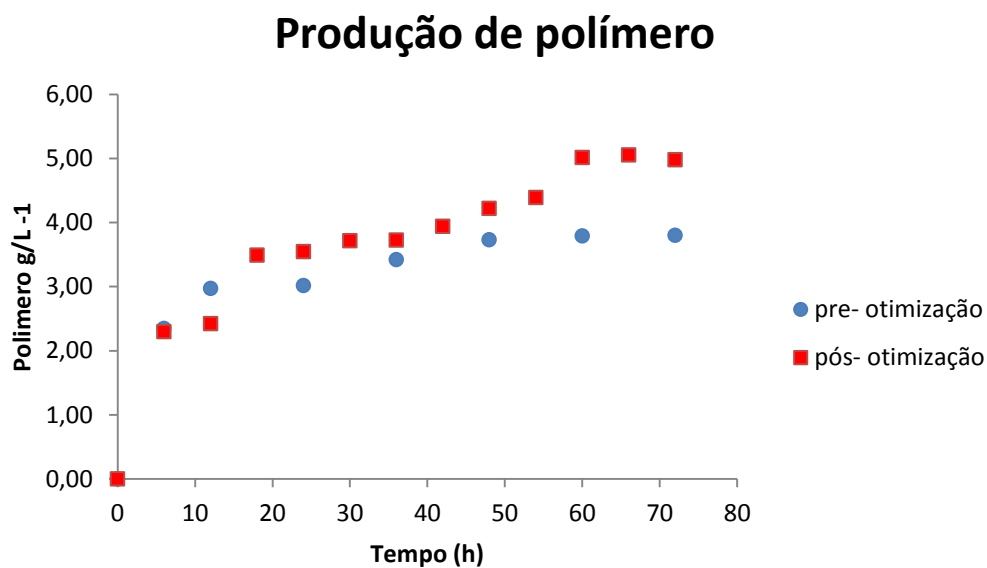
alcançando a máxima de produção de $5,054 \text{ g.L}^{-1}$ em 66 horas de fermentação, e que o aumento da síntese do polímero ocorreu na fase estacionária do crescimento bacteriano.

Figura 19 - Gráfico da cinética de produção em condições operacionais otimizadas.



Avaliando a produção de polímero pre- otimização e pós- otimização de processo (figura 20), fica evidente um aumento na produção de biopolímero ($0,05 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$) o que parece ser 1.6 vezes maior que o melhor resultado obtido antes da otimização.

Figura 20 - Gráfico da cinética de produção nas condições pré e pós-otimização.



Para a validação da otimização do processo de produção, os parâmetros otimizados pela metodologia de superfície de resposta foram: temperatura 35°C, pH 7,0 e rotação 240 rpm, como também foi feita análise dos fatores nutricionais e concentração de fontes de carbono. A fonte de carbono testada que apresentou melhor resultado de produção foi o glicerol na concentração de 3%.

Vale salientar que existem poucas informações na literatura sobre as condições de produção de biopolímero por *Enterobacter amnigenus*. Cescutti et al., (2005), reportaram as condições ideais como sendo temperatura 30°C e rotação 150 rpm e como fonte de carbono a sacarose. Prasertsan et al., (2008), em seus experimentos com *Enterobacter cloacae* obteve produção de 2,23 g.L⁻¹, com maior rendimento em torno de 72 horas (3 dias), na fase estacionária. Alves et al., (2010), reportou melhor produção utilizando cepa de *Enterobacter* sp., que sintetizou um exopolissacarídeo em meio suplementado com glicerol como fonte de carbono, obtendo assim produção de polímero desde o início da curva de crescimento chegando a 13,28 g.L⁻¹. Freitas et al., (2011^b) produziu exopolissacarídeo contendo fucose sintetizado por *Enterobacter* com condições otimizadas com temperatura de 30°C, e pH 7,0 em meio de cultura suplementado com glicerol apresentando uma produção de polímero de 8,1 g.L⁻¹. Nesse estudo foi observado a produção de 5,012 g.L⁻¹ em 60 horas de incubação utilizando glicerol como única fonte de carbono.

A tabela 16 e 17 mostra o tratamento estatístico dos dados comparando os pontos 60, 66 e 72 horas, e não foi observado diferença significativa entre os valores 5,012 g.L⁻¹, 5,054⁻¹ g.L⁻¹ e 4,976 g.L⁻¹, respectivamente. Mediante tais resultados a redução do tempo de produção para 60 horas, pode representar uma redução de custo no do processo industrial. Na figura 21, esta representado o aspecto do polímero precipitado em álcool e pós extração do álcool.

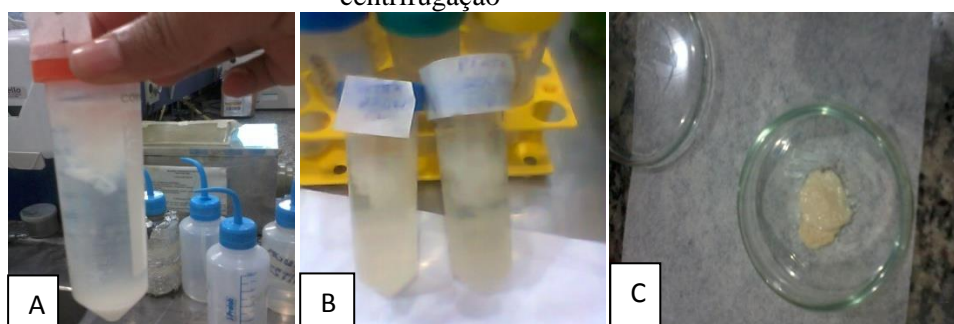
Tabela - 16 Análise de variância da produção do polímero

| Grupo | Contagem | Soma | Média | Variância |
|----------|----------|--------|-------|------------|
| 60 horas | 3 | 15,036 | 5,012 | 0,002704 |
| 66 horas | 3 | 15,162 | 5,054 | 0,001516 |
| 72 horas | 3 | 14,93 | 4,977 | 0,00103333 |

Tabela 17- Análise estatística A NOVA dos polímeros produzidos pós otimização do Superfície de Resposta

| Fonte da variação | SQ | gl | MQ | F | valor-P | F crítico |
|-------------------|-------------|----|-------------|-------|---------|-----------|
| Entre grupos | 0,008992889 | 2 | 0,004496444 | 2,570 | 0,1564 | 5,143 |
| Dentro dos grupos | 0,010506667 | 6 | 0,001751111 | | | |
| Total | 0,019499556 | 8 | | | | |

Figura 21 - A e B aspecto do EPS após precipitação em álcool, C após centrifugação

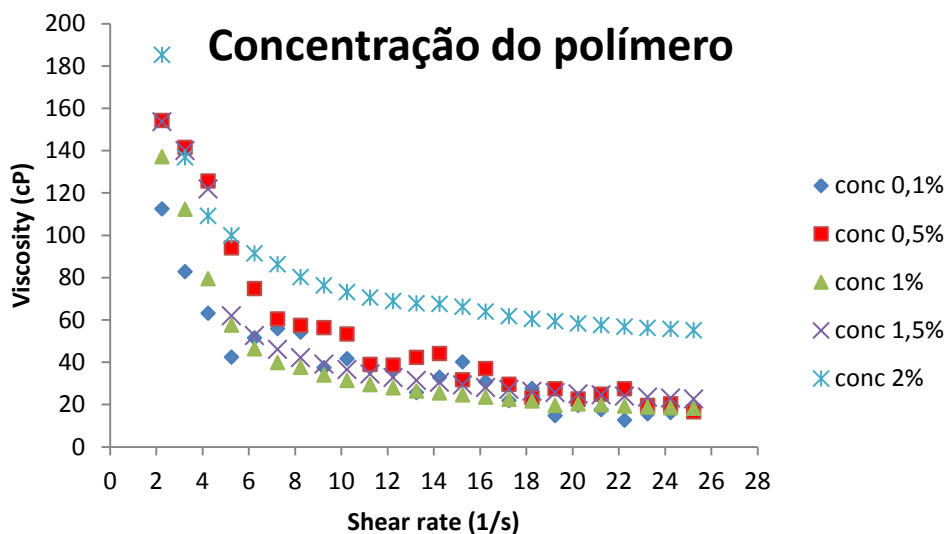


5.6 CARACTERIZAÇÃO DO BIOPOLÍMERO PRODUZIDO

5.6.1 Análise da viscosidade

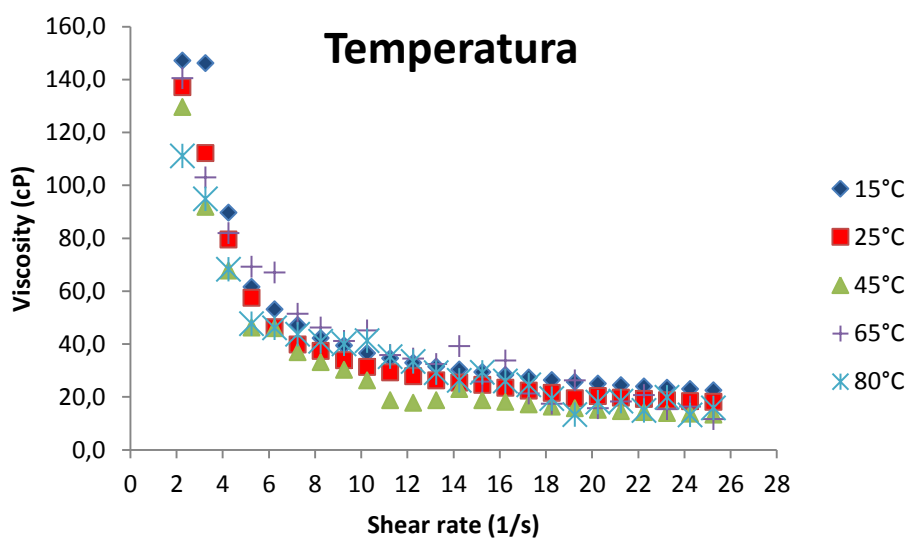
Para avaliar a qualidade do biopolímero produzido por *Enterobacter amnigenus* como viscosificante de fluído, foi analisada a viscosidade aparente das seguintes soluções: soluções aquosas preparadas com diferentes concentrações do EPS, soluções aquosas do EPS com diferentes concentrações de sal, e solução aquosa do EPS testadas em temperaturas variadas. Os dados das viscosidades obtidos estão representados nas figuras 22, 23 e 24.

Figura 22 - Viscosidade aparente de soluções aquosa do EPS sintetizado por *Enterobacter amnigenus*, em diferentes concentrações.



Analisando a figura 22 a viscosidade da solução aquosa com concentração a 2% de EPS mostrou-se superior em relação às demais concentrações testadas. Após a taxa de 12 s^{-1} a viscosidade da concentração a 2% se manteve constante com viscosidade de 60 cP. As análises individuais encontram-se em (APENDICE A).

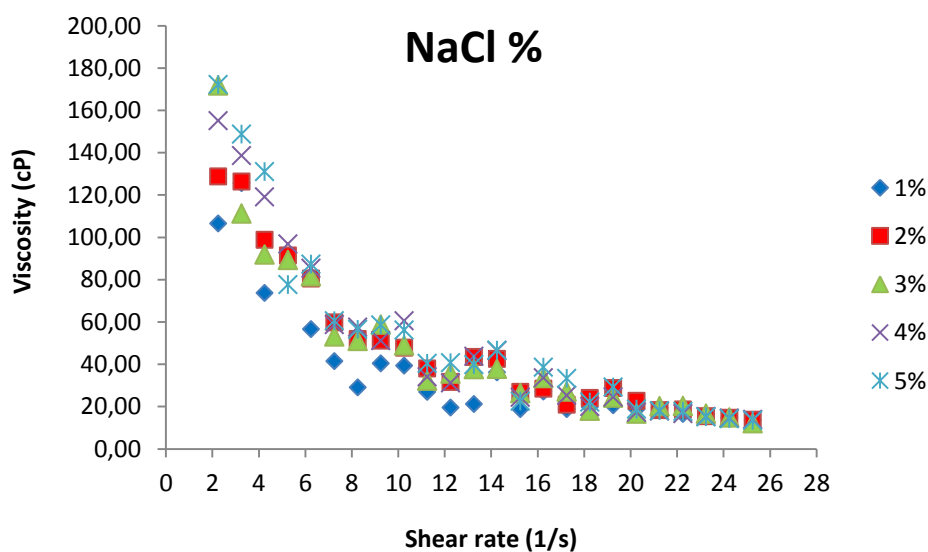
Figura 23 - Viscosidade aparente de soluções aquosa com 1% de EPS sintetizado por *Enterobacter amnigenus* em diferentes temperaturas.



Na figura 23 observa-se que a variação da viscosidade aparente da solução de 1% teve resultado similar nas diferentes faixas de temperatura testadas. Houve um decaimento significativo até a taxa de 12 s^{-1} , mas, estabilizou-se em torno de 25 e 18 cP para as temperaturas de 15 e 25°C e 45, 65 e 80°C, respectivamente. As análises individuais encontram-se em (APÊNDICE B).

A Figura 24 mostra os resultados de viscosidade aparente de soluções aquosas com 1% de EPS em diferentes concentrações de NaCl. Observa-se que há um aumento da viscosidade inicial das soluções com o aumento da concentração de sal. Nas soluções com concentrações a partir de 3% de NaCl a viscosidade ficou em torno de 180 cP, enquanto nas concentrações de 1 e 2% ficaram em 130 cP. (APÊNDICE C). Possivelmente essa variação nos dados foi resultante da interação do sal com as moléculas do polímero. No entanto, percebe-se que não houve uma estabilidade da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento. Em uma revisão realizada por Diaz et al., (2004), sobre a influência de eletrólitos na viscosidade de fluidos com goma xantana, ele informa que a adição de sais em baixa concentração de polímero pode reduzir o valor do módulo elástico. Este comportamento pode estar relacionado com alterações na conformação do polímero.

Figura 24 - Viscosidade aparente de soluções aquosa com 1% de EPS sintetizado por *Enterobacter amnigenus*, com diferentes concentrações de NaCl.

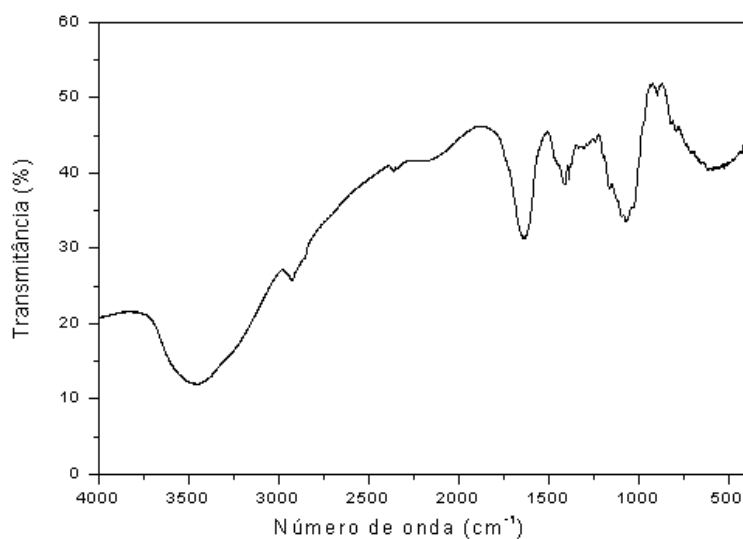


Em todas as amostras analisadas, ficou evidente o comportamento pseudoplástico das soluções. De acordo com Padilha (2003) esse comportamento reológico é comum em exopolissacarídeo microbiano, ou seja, ocorre a diminuição da viscosidade aparente com o aumento da tensão sobre o fluido. Um dos exemplos de exopolissacarídeo com propriedades pseudoplásticas é a goma xantana (GARCIA-OCHOA et al., 2000). Os parâmetros estimados com o modelo Ostwald-de- Waele mostraram uma variação reológica utilizável como fluidos de atividades de perfuração (μ variando entre 12 a 17 cP/s).

5.6.2 Caracterização do biopolímero por espectroscopia infravermelho

A caracterização do polímero sintetizado por *Enterobacter amnigenus* utilizando glicerol como fonte de carbono, foi realizada pela técnica de espectroscopia na região do infravermelho. O polímero produzido foi comparado com um polímero comercial, a goma xantana. A Figura 25 mostra a caracterização do resultado de infravermelho da goma xantana.

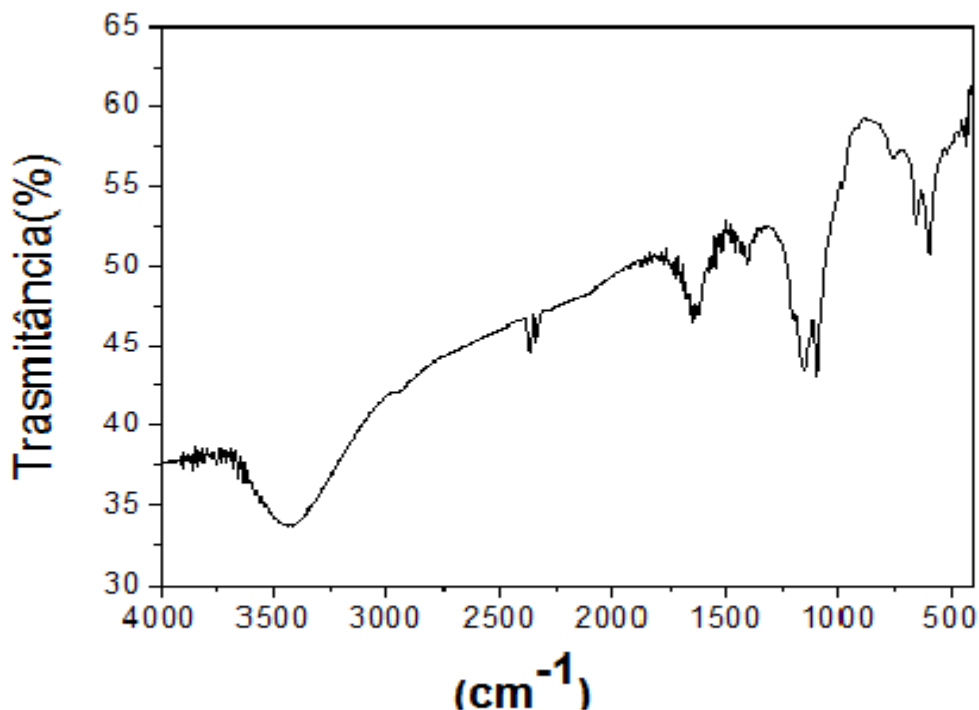
Figura 25 - Espectro realizado na região do infravermelho do polímero comercial.



Analisando o espectro do polímero comercial a goma xantana, verifica-se que a banda na região 3200 a 3450 cm^{-1} se refere ao grupo hidroxila (OH), as bandas que aparecem na região 2850 a 2950 cm^{-1} são atribuídas a ligações C-H e CHO. As bandas que aparecem na região entre 1710 e 1730 cm^{-1} são características do estiramento C=O da função dos grupos éster, ácidos carboxílicos, aldeídos e cetonas. Os picos na região entre 1050 a 1150 cm^{-1} , nota-se uma deformação axial de C-O, típica de éteres, alcoóis, fenóis, ácidos graxos, ésteres e anidridos (RAMOS, 2011).

Analisando o espectro do polímero produzido por *Enterobacter amnigenus*, representado na figura 26 foi possível observar uma banda na região de 3600 a 3000 (cm^{-1}), esse resultado indica a presença do grupo hidroxila (OH) possivelmente de uma amida, porém a banda no espectrograma é larga podendo haver sobreposição. As bandas formadas entre a região acima citada sugerem a presença de fenóis, ou proveniente de algum composto carbonáceo ligado a hidroxila. A banda na região entre 2400 e 2300 (cm^{-1}) sugere compostos nitrogenados, podendo ter indicação de uma nitrila. As bandas na região 1600 e 1740 (cm^{-1}) sugerem a presença de éster, amida e cetona. A banda 600 - 640 (cm^{-1}) é característica da presença de haletos, indicando halogênios cloro e ou bromo. Comparando o espectro produzido pela *Enterobacter amnigenus*, com resultados obtidos na literatura, foi possível observar similaridade, da espectrometria na região do infravermelho do polímero produzido por *Enterobacter cloacae* apresentado por Naik (2012); bem como com o polímero comercial goma xantana, e resultados obtidos por Moitinho (2011), com polímeros produzidos por *Xantomonas campestris*.

Figura 26 - Espectrometria na região do infravermelho do polímero sintetizado por *Enterobacter amnigenus*.



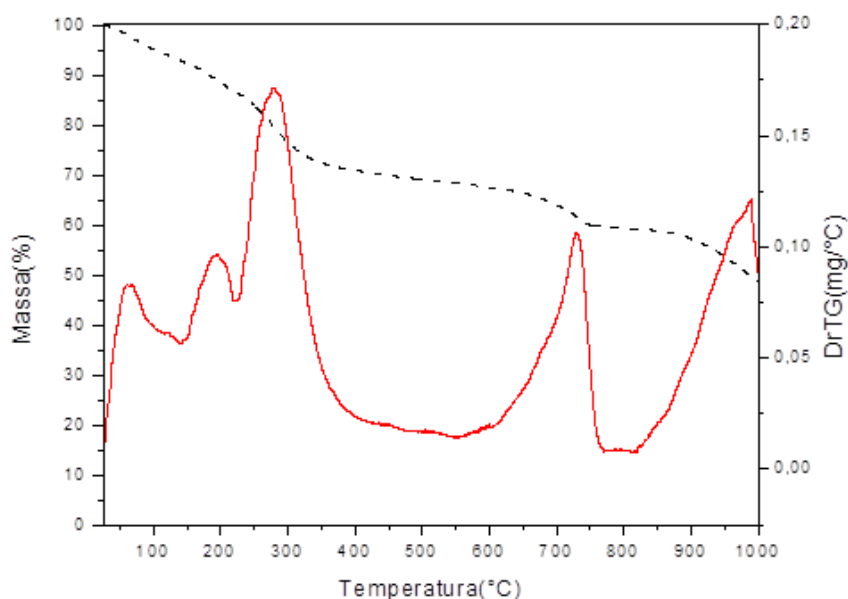
5.6.3 Análise de termogravimetria

Para avaliar as propriedades térmicas do polímero produzido pela bactéria *Enterobacter amnigenus*, foi realizado testes de análises termogravimétrica. Esta análise foi desenvolvida de forma dinâmica, ou seja, perda de peso em função da temperatura. Na figura 27 estão dispostos os resultados obtidos das amostras de biopolímero, representados pelo termograma.

Durante o teste foi possível observar vários eventos de perda de massa correspondente a decomposição térmica do polímero. Ao atingir a temperatura de 100°C houve a primeira etapa de degradação que corresponde a perda de água. Quando a temperatura atingiu a faixa de 300°C, houve perda de compostos mais voláteis. Os eventos de perda de massa posteriores possivelmente foram de processo de carbonização ou a perda de metais. Também é possível observar que até atingir 1000°C ainda existem em média 50% do biopolímero, que são frações de materiais inorgânicos.

Wang et al., (2010) relatou que a perda inicial de massa do polímero está associada a umidade da amostra e que a decomposição do polímero inicia-se acima de 100°C sendo a maior perda de massa atingida a partir de 300°C. Estes dados também foram observados por Zohuriaan (2004).

Figura 27 – Termograma de análise termogravimétrica do biopolímero sintetizado por *E. amnigenus*



5.7 PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO POR *Enterobacter amnigenus* COM MEIO DE PRODUÇÃO A BASE DE ÁGUA PRODUZIDA

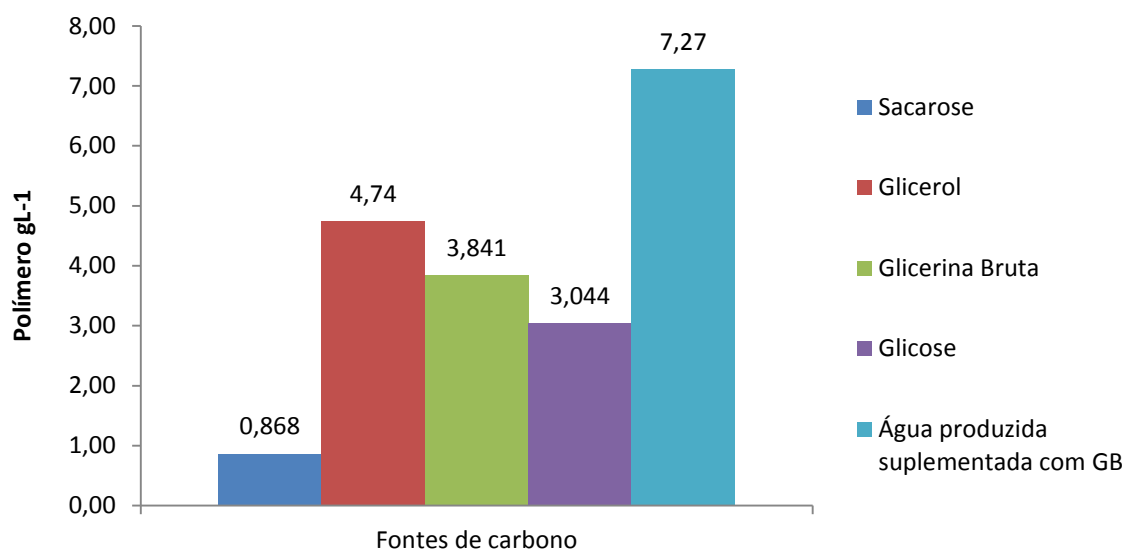
Para avaliar a capacidade da *Enterobacter amnigenus* de metabolizar resíduos gerados a partir da indústria petroquímica foram realizados ensaios utilizando efluentes da indústria do petróleo como água produzida, utilizada como base de meio de produção, e a glicerina bruta, resíduo gerado do processo da transesterificação do biodiesel, como a fonte principal de carbono do meio de produção. A tabela 18 representa o resultado obtido neste ensaio.

Tabela 18- Produção de biopolímero utilizando resíduos da indústria petroquímica

| Teste | Cepa | Produção g.L ⁻¹ | Desvio Padrão |
|-------|---------------------|-------------------------------|------------------|
| 1 | <i>E. amnigenus</i> | 7,27 | 0,15 |

Os resultados mostram que a *Enterobacter amnigenus* além de metabolizar os resíduos presentes no meio de produção, também apresenta melhores resultados quando comparados com os testes realizados em meio marinho suplementado com sacarose, glicose, glicerol e/ou glicerina bruta. A figura 28 compara os resultados obtidos nos diferentes processos de produção.

Figura 28 - Gráfico representativo de produção de polímero em diferentes condições nutricionais



Ramos (2011) relata a produção de exopolissacarídeo por *Xanthomonas campestris* em água produzida e glicerina bruta. O autor relata valores de 8,31 g.L⁻¹ e 8,95 g.L⁻¹ dependendo da origem da água de produção. Esse trabalho mostra que, nas mesmas condições, a produção de polímero por *Enterobacter amnigenus* pode chegar a 7,27 g.L⁻¹. A *Xanthomonas campestris* é reconhecida como sendo uma das bactérias

mais produtiva na formação de EPS, porém, as características do EPS de *Enterobacter amnigenus* podem compensar pela pequena diferença de produtividade.

Com o resultado obtido neste ensaio, foi possível concluir que a cepa de *Enterobacter amnigenus* foi capaz de sintetizar um biopolímero utilizando resíduos como água produzida e glicerina bruta. Dessa forma, a *E. amnigenus* tem potencial para ser utilizada como produtora de polímero em escala industrial, utilizando rejeitos da indústria de energia, apresentando como um fator positivo o redirecionamento da aplicação destes resíduos, bem como redução dos custos do processo de produção, já que a fonte de carbono é um dos principais fatores que encarece a produção de biopolímeros. Finalmente, este polímero produzido poderá ser destinado a indústria do petróleo.

6. CONCLUSÕES

- Os testes que comparam a produção de EPS pelas cepas de *Enterobacter* CCMICS 544 e CCMICS 549 identificam essa última como a melhor produtora em *in vitro* capaz de produzir acima de $4,0 \text{ gL}^{-1}$ em aproximadamente 36 horas.
- As provas bioquímicas identificaram a cepa CCMICS 544 como sendo *Enterobacter cloacae* (99%) e a cepa CCMICS 549 como *Enterobacter* sp (90%).
- Análise do 16S ribossomal identifica a cepa CCMICS 549 como *Enterobacter amnigenus*. A combinação dos resultados filogenéticos e bioquímicos sugerem que essa cepa seja uma variedade distinta caracterizada como grupo ou variedade 2 da espécie *Enterobacter amnigenus*.
- A *Enterobacter amnigenus* testada foi capaz de metabolizar substratos orgânicos provenientes de resíduos da indústria do petróleo na presença de concentração de sal equivalentes a da água do mar ($\geq 3\%$).
- A melhor concentração de glicerol e glicerina bruta para a produção de EPS por *Enterobacter amnigenus* foi ao redor de 3% v/v.
- A otimização do meio mineral marinho para a produção de EPS por *Enterobacter amnigenus* realizado através da metodologia de “Superfície-Resposta” identificou as condições de 35°C , pH 7,0, rotação de 240 rpm, e glicerol 3% como sendo as ideais para produção de EPS. Nessas condições a cepa mostrou uma produção de EPS de $0,05 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$. Utilizando os resíduos da indústria do petróleo como o glicerol não purificado e água produzida foi possível produzir $7,27 \text{ gL}^{-1}$ de EPS em aproximadamente 60 horas.
- O polímero produzido apresentou comportamento reológico pseudoplásticos, característicos de soluções poliméricas de polissacarídeos microbianos. Nesses termos, o melhor resultado de viscosidade da goma produzida com o EPS foi em solução contendo a concentração de 2%.
- Em análises termogravimétricas o polímero produzido apresentou perda de massa máxima com a temperatura em torno de 300°C , mantendo-se com 50% da massa total após exposição 1000°C indicando significativa presença de material mineral.
- Em análise de espectroscopia na região de infravermelho o biopolímero produzido mostrou uma composição semelhante à da goma comercial xantana.

REFERÊNCIAS

- AHMADUN, F. R.; PENDASHTEH, A.; ABDULLAN, L. C.; BIAK, D. R. A.; MADAENI, S. S.; ABIDIN, Z. Z. **Review of technologies for oil and gas produced water treatment.** Journal of Hazardous Materials. V. 170. P. 530-55. 2009.
- ALMEIDA, F. P.; SOUZA, V. S. C. L.; RAMOS, B. F. M.; SANTOS, S. C.; MATOS, J. B. T. L.; CHINALIA, F. A.; FERREIRA, J.; QUINTELLA, C.; ANDRADE, E. . **Formulação de meios de cultura alternativos para produção de bioativos.** Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020130230758, data de depósito: 10/09/2013.
- ALVES, D. A.; FREITAS, F.; TORRES, C. A. V.; CRUZ, M.; MARQUES, R.; GRANDFILS, C.; GONCALVES, M. P.; OLIVEIRA, R.; REIS, M. A. M. **Rheological and morphological characterization of the culture broth during exopolysaccharide production by *Enterobacter sp.*** Carbohydrate Polymers. V. 81. P. 758-764. 2010.
- AMAN, A.; SIDDIQUI, N. N.; QADER, S. A. U.; **Characterization and potential applications of high molecular weight dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* AA1.** Carbohydrate Polymers. V. 87. P. 910-915. 2012.
- BACHMANN, R. T.; JOHNSON, A. C.; EDYVEAN, R. G. J. **Biotechnology in the petroleum industry: An overview.** International Biodeterioration & Biodegradation. V. 86. P. 225-237. 2014.
- BANDAIPHET, C.; PRASERTSAN, P. **Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, $k_L a$ in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7.** Carbohydrate Polymers. V. 66. P. 216-228. 2006.
- BERECKA, M. P.; WAŚKO, A.; SZWAJGIER, D.; CHOMA, A. **Bifidogenic and Antioxidant Activity of Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus rhamnosus* E/N Cultivated on Different Carbon Sources.** Polish Journal of Microbiology. V. 62. P. 181-189. 2013.
- BERWANGER, A. L. S.; SCAMPARINI, A. R. P.; DOMINGUES, N. M.; VANZO, L. T.; TREICHEL, H.; PADILHA, F. F. **Biopolymer production synthesized by *Sphingomonas capsulata*, using industrial media.** Ciênc. agrotec., Lavras, v. 31, n. 1, p. 177-183, 2006.
- BORGES, C. D. **Estudo das condições operacionais na produção de xantana por *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo.** Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.
- BORGES, C. D.; VENDRUSCULO, C. T.; MARTINS, A. L.; LOMBA, R. F. T. **Comportamento reológico de xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo.** Polímeros:

Ciência e Tecnologia, v. 19. n° 2. p. 160-165. 2009.

BOZA, Yolanda E. A. G. **Encapsulamento *Beijerinckia sp* utilizando spray-drier**. Departamento de Ciência de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, 2002.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. Sao Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda., v. 3, 2001.

BRANDÃO, L.V.; ESPERIDÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I. **Utilização do Soro de Mandioca como Substrato Fermentativo para a Biosíntese de Goma Xantana: Viscosidade Aparente e Produção**. *Polímeros*, vol. 20, n° 3, p. 175-180, 2010.

BRADY, C.; CLEENWERCK, I., VENTER, S., COUTINHO, T., VOS, P. **Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus Sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *elliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *osakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *ronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter***. *Systematic and Applied Microbiology*. Vol. 36, p. 309-319, 2013.

CANUTO, A. P. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de goma xantana por fermentação no estado sólido a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

CASAS, J.A., SANTOS, V.E., GARCÍA-OCHOA, F. **Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties**. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 26, p. 282–291. 2000.

CHÁVEZ, J. D. **Aproveitamento biotecnológico do glicerol derivado da produção de biodiesel para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos**. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CESCUTTI, P., KALLIOINEN, A., IMPALLOMENI, G., TOFFANIN, R., POLLESELLO, P., LEISOLA, M., EERIKÄINEN, T. **Structure of the exopolysaccharide produced by *Enterobacter amnigenus***. *Carbohydrate Research*. v.340, p.439–447. 2005.

COLEMAN, R.J.; PATEL, Y.N.; HARDING, N. E. **Identification and organization of genes for diutan polysaccharide synthesis from *Sphingomonas sp.* ATCC 53159**. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. v. 35, p 263-274. 2008.

- DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. **Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium.** *Bioresource Technology*, v. 100. p. 1015–1019. 2009.
- DIAZ, P. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; VENDRUSCOLO, J. L. S. **Reologia de Xantana: uma Revisão sobre a Influência de Eletrólitos na Viscosidade de Soluções Aquosas de Gomas Xantana.** *Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 25, n. 1, p. 15-28, 2004.
- DONOT, A. F.; FONTANA, J. C.; SSCHORR, G. **Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction.** *Carbohydrate Polymers*. v. 87 p. 951–962. 2012.
- DRUZIAN, J. I; PAGLIARIN, A.P. **Produção de goma xantana por fermentação do resíduo de suco de maçã.** *Ciência Tecnologia de Alimentos*. vol.27 no.1. 2007.
- FARMER, J.J.; DAVIS, B.R.; HICKMAN-BRENNER, F.W.; WHORTER, A.; HUNTLEY CATER, G.P.; ASBURY, M.A.; RIDDLE, C.; WATHEN GRADY, C.; FANNING, G.R. **Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens.** *Journal Clinical Microbiology*. Vol. 21, p. 46-76, 1985.
- FAKSNESS, L. G.; GRINI, P. G. **Daling, Partitioning of semi-soluble organic compounds between the water phase and oil droplets in produced water, Mar.** *Marine Pollution Bulletin*. v. 48, p. 731-742, 2004.
- FREITAS, F; ALVES, V.D.; PAIS, J.; COSTA, N. ; OLIVEIRA, C.; MAFRA, L. ; HILIOU, L. ; OLIVEIRA, R. ; REIS, M.A.M. **Characterization of a extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol** *Bioresource Technology*, pp. 859–865; 2009.
- FREITAS, F. ALVES, V. D.; REIS, M. A. M. **Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications.** *Trends in Biotechnology*. V. 29. P. 388–398. 2011^a.
- FREITAS, F.; ALVES, V. D.; TORRES, C. A.A.V.; CRUZ, M.; SOUSA, I.; MELO, M. J.; RAMOS, A.M.; REIS, M.A.M. **Fucose-containing exopolysaccharide produced by the newly isolated Enterobacter strain A47 DSM 23139.** *Carbohydrate Polymers* v.83. p.159–165. 2011^b.
- GAO, C. H.; ZEKRI, A. **Applications of microbial-enhanced oil recovery technology in the past decade.** *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects*. v. 33, p. 972-989, 2011.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. **Xanthan gum: production, recovery and properties.** *Biotechnology Advances*, New York, v. 18, n. 7, p. 549-579, nov. 2000.

GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, A. N. S. **Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção.** *Química Nova* v.31 n7 São Paulo 2008.

GOMES, E. A. **Tratamento combinado da água produzida de petróleo por eletroflotação e processo fenton.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade Tiradentes, Aracajú, SE. 2009.

GUDINÃ, E. J.; PEREIRA, J. F. B.; RODRIGUES, L. R. **Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in Microbial Enhanced Oil Recovery.** *International Biodeterioration & Biodegradation*. v. 68. P. 56-64. 2012.

HANSEN, B.R.; DAVIES, S.H.; **Review of potential technologies for the removal of dissolved components from produced water.** *Chem. Eng. Res. Des.* v.72 p. 176-188, 1994.

HARNER, N.K.; RICHARDSON, T.L.; THOMPSON, K.A.; BEST, R. J.; BEST, A.S.; TREVORS, J.T. **Microbial processes in the Athabasca oil sands and their potential applications in microbial enhanced oil recovery** *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 38 p. 1761–1775, 2011.

HENDERSON, S.B.; GRIGSON, S.J.W.; JONHSON, P. RODDIE, B.D. **Potencial Impact of Production Chemicals on the Toxicity of Produced Water Discharges from North Sea Oil Platforms.** *Marine Pollution Bulletin*, v.38, n.12, p.1141-1151, 1999.

HUA, X.; WU, Z.; ZHANG, H.; LU, D.; WANG, M.; LIU, Y.; LIU, Z. **Degradation of hexadecane by *Enterobacter cloacae* strain TU that secretes an exopolysaccharide as a bioemulsifier.** *Chemosphere*. v. 80, p.951–956. 2010.

HUANG, W.; CHEN, S.; CHEN, T. L. **Modeling the microbial production of hyaluronic acid.** *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*. v. 38, p. 355–359. 2007.

JIANG, L. **Optimization of fermentation conditions for pullulan production by *Aureobasidium pullulan* using response surface methodology.** *Carbohydrate Polymers*, v.79. p.414–417. 2010.

JITRWUNG, R.; VERRETT, J.; YARGEAU, V. **Optimization of selected salts concentration for improved biohydrogen production from biodiesel-based glycerol using *Enterobacter aerogenes***. *Renewable Energy*. v. 50, p. 222-226, 2013.

KALOGIANNIS, S.; IAKOVIDOU, G.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDIS, D.A.; SKARACIS, G.N. **Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses**. *Process Biochemistry*, v.39, p.249-256. 2003.

KONEMAN, E.; WINN, W.J.; ALLEN, S. ; JANDA, E.; PROCOP, G.; CHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Diagnóstico Microbiológico texto e atlas colorido**. Ed. 6º, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

KUMAR, A.S; MODY, K; JHA, B. **Bacterial exopolysaccharides—a perception**. *Journal of Basic Microbiology*, v.47, p. 103–117. 2007.

LAZAR, I.; PETRISOR, I. G.; YEN, T. F. *Petroleum Science and Technology*. **Microbial enhanced oil recovery (MEOR)**. v. 25, p. 1353-1366, 2007.

LEONETI, A. B.; LEONETI, V. A.; OLIVEIRA, S.V.W.B. **Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use**. *Renewable Energy*. v. 45, p. 138-145, 2012.

LUVIELMO, M. M; VENDRUSCOLO. C. T; SCAMPARINI, A.R. P. **Seleção de linhagens de *Xanthomonas campestris* para a produção de goma xantana**. *Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina*, v. 28, n.2, p. 161-172, jul./dez. 2007.

LUVIELMO, M. M.; SCAMPARINI, A.R. P. **Xanthan gum: Production, recovery, properties and application**. *Estudos tecnológicos- Vol, 5 n° 1: 50-67*, 2009.

LYER, A., MODY, K., JHA, B., **Characterization of an exopolysaccharide produced by a marine *Enterobacter cloacae***. *Indian j. Exp. Biol.* Vol. 43, p. 467-471, 2005.

MARCHANT, R.; BANAT, I.M. **Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation**. *Trends in Biotechnology*. Vol 30, n. 11, 2012.

MESOMO, M. C. **Produção de goma xantana e biorreator utilizando meio a base de soro de queijo**. Dissertação de Mestrado. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim. 2007.

- MOITINHO, B.M. **Análise da expressão diferencial de genes relacionados à produção de xantana em *Xanthomonas arboricola* e *Enterobacter cloacae*.** Dissertação (Mestrado)Universidade Federal da Bahia UFBA, Salvador, Bahia, 2012.
- MOREIRA, A. S. **Producao, caracterizacao e aplicacao do biopolimero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni*.** Pelotas, Tese Doutorado - Programa de Doutorado em Biotecnologia - Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, (UFPel); 2002.
- MORENO, J., VARGAS, M. A., OLIVARES, H., RIVAS, J., GUERRERO, M. G. **Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture.** Journal of Biotechnology, vol. 60, p. 175–182. 1998.
- MORRIS, E. R.; NISHINARI, K.; RINAUDO, M. **Gelation of gellan e A review.** Food Hydrocolloids v.28, p. 373-411, 2012.
- MUSTAFA, G. S.; SOUZA, A. O. A. B.; ROCHA, P. S. M. V. **Utilização de emissões industriais gasosas para rejuvenescimento de campos maduros de petróleo.** Engenharia Sanitária e Ambiental. v.8 p. 209-221, 2003.
- NAIK, M. M.; PANDEY, A.; DUBEY, S. K. **Biological characterization of leadenhanced exopolysaccharide produced by a lead resistant *Enterobacter cloacae* strain P2B.** Biodegradation. N.23. p.775–783. 2012.
- NARANG, A., KONOPKA, A., RAMKRISHNA, D. **New patterns of mixed substrate growth in batch cultures of *Escherichia coli*K12.** Biotechnology and Bioengineering. v. 55, p. 747-757, 1997.
- NAVARRETE, R. C.; SHAN, S. N. **New Biopolymer for coiled tubing applications.** Society of Petroleum Engineers, 68487, Richardson, TX, USA, 1- 10, 2001.
- PACE, G. **Polímeros microbianos.** In: BU'LOOCK, J.; KRISTIANSEN, B. Biotecnología Básica. Traducción: Paloma Liras Padín. Zaragoza: Acribia, p. 449-462,1991.
- PADILHA, F.F. **Produção de Biopolímeros por Microorganismos Modificados Geneticamente.** Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, 2003.
- PAN, A.; MOREIRA, A.; S.; VENDRUSCOLO, C. T. **Efeito da concentração inicial do inóculo no crescimento celular e qualidade de biopolímeros de *Xantomonas campestris* pv. *pruni* cepa 06.** Rev. Bras. de Agrociência, v.6 no3, 273-277. 2000.
- PATIL, S. V. , SALUNKHE, R. B.; PATIL1, C. D.; PATIL, D. M.; SALUNKE, B. K. **Biofloculant Exopolysaccharide Production by *Azotobacter indicus* Using**

Flower Extract of *Madhuca latifolia* L. Appl Biochem Biotechnol. V. 162, p. 1095-1108, 2009.

PIRES, A. M. B.; MACEDO, A. C.; EGUCHI, S. Y.; SANTANA, M. H. A. **Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives.** Bioresource Technology v.101, p.6506–6509, 2010.

PRADELLA, J.G.C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos.** Relatório técnico n. 84396-205. Centro de Tecnologia de Processos e Produtos. Laboratório de Biotecnologia Industrial – LBI/CTPP. São Paulo. 2006.

PRASERTSAN, P., WICHIENTHOT, S., DOELLE, H., KENNEDY, J., **Optimization for biopolymer production by *Enterobacter cloacae* WD7.** Carbohydrate Polymers 71 (3), 468–475, 2008.

PSOMAS, S.K.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDIS, D.A. **Optimization study of xanthan gum production using response surface methodology.** Biochemical Engineering Journal, v. 35 , p. 273–280, 2007.

QUISPE, C. A. G.; CORONADO, C. J. R.; Jr, J. A. C. **Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion.** Renewable and Sustainable Energy Reviews. v. 27, p. 475-493, 2013.

RAMOS, B. F. M. **Produção de Goma Xantana em Água Produzida da Indústria de Petróleo.** Dissertação (Mestrado) Universidade Federal da Bahia UFBA, Salvador, Bahia, 2011.

RAZACK, S A.; VELAYUTHAM, V.; THANGAVELU, V. **Influence Of Various Parameters On Exopolysaccharide Production From *Bacillus subtilis*.** International Journal of ChemTech Research. v. 5, p. 2221-2228, 2013.

RAVELLA, S. R.; QUIÑONES, T. S. R.; RETTER, A.; HEIERMANN, M.; AMON, T.; HOBBS, P. **Extracellular polysaccharide (EPS) production by a novel strain of yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans*.** Carbohydrate Polymers. v82. p. 728-732. 2010.

REHM, B. H.A. **Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors Applications and Perspectives.** P. 242, Causter Academic press, 2009.

REHM, B. H.A. **Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications.** *Nature Reviews Microbiology* VOL 8 N 8 , P.578-592, 2010.

ROSALAM, S., ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from

unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, 939: 197-207, 2006.

ROTTAVA, I. **Seleção de Linhagens de Xanthomonas sp para produção de Goma Xantana**. Dissertação de mestrado. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim. RS, 2005.

ROTTAVA, I.; BATESINI, G.; SILVA, M. F.; LERIN, L.; OLIVEIRA, D.; PADILHA, F. F.; TONIAZZO, G.; MOSSI, A.; CANSIAN, R. L.; LUCCIOB, M. D.; TREICHEL, H. **Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of Xanthomonas sp**. Carbohydrate Polymers. v. 77, p. 65-71, 2009.

SEN, R. **Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR**. Progress in Energy and Combustion Science . v.34, p. 714–724. 2008.

SHANSHAN, S.; ZHONGZHI, Z.; YIJING, L.; WEIZHANG, Z.; MENG, X.; WENJING, Y.; LI, Y.; PENGCHENG, F. **Exopolysaccharide production by genetically engineered *Enterobacter cloacae* strain for microbial enhanced oil recovery**. Bioresource Technology. v.102, p. 6153 – 6158, 2011.

SILVA, C.R.R. **Água produzida na extração de petróleo**. Especialização em gerenciamento e tecnologia ambiental. Escola politécnica. Salvador, Bahia, 2000.

SILVA,G.P.; MACK, M.; CONTIERO J. **Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology**. Biotechnology Advances. v.27. p.30-39. 2009.

SOCCOL, C. R.; WOIECHOWSKI, A. L.; PANDEY, A. **Production of xanthan gum from cassava bagasse hydrolysate**; Brazilian Patent no INPI No 001544, Instituto Nacional de Propriedade Industrial, Brazil, December 27, 2000.

SOUDMAND-ASLI, A., AYATOLLAHI, S.S., MOHABATKAR, H., ZAREIE, M., SHARIATPANAHI, S.F. **The in situ microbial enhanced oil recovery in fractured porous media**. Journal of Petroleum Science and Engineering. v. 58, p.161-172, 2007.

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. **Advances in Microbial Physiology**. v. 23, p. 80-142, 1982.

SUTHERLAND, I.W. Biotechnology of microbial exopolysaccharides. **In: Cambridge Studies in Biotechnology**. Cambridge University Press, Cambridge, p. 1 – 163. 1990.

TAN, H.W.; ABDULAZIZ, A.R.; AROUA, M.K. **Glycerol production and its application as a raw material: A review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, vol 27, P.118-127, 2013.

TAKEUCHI, A.; KAMIRYOU, Y.; YAMADA, H.; ETO, M.; SHIBATA, K.; NAITO, S. **Oral administration of xanthan gum enhances antitumor activity through Toll-like receptor 4.** Int. Immunopharmacol. vol. 9, p. 1562–1567, 2009.

THOMPSON, J.C.; HE, B. **Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks.** Applied Engineering in Agriculture, v. 22, p.261-265, 2006.

TORRES, C.A.V.; ANTUNES, S.; RICARDO, A.R.; GRANDFILD, C.; ALVES, F.F.; REIS, M.A.M. **Study of the interactive effect of temperature and pH on exopolysaccharide production by Enterobacter A47 using multivariate statistical analysis.** Bioresource Technology. v.119, p.148–156, 2012.

VASCONCELOS, Y. Resíduos bem-vindos. Subproduto do biodiesel pode ser usado para suprimir poeira de vagões de minério. **Revista Fapesp.** São Paulo, Ed. 196, 2012.

VEIL, John A. Veil; KIMMELL Todd A.; RECHNER, Abbey C. **Characteristics of Produced Water Discharged to the Gulf of Mexico Hypoxic Zone.** U.S. Department of Energy National Energy Technology Laboratory . The University of Chicago for the U. S. Department of Energy., 2005.

WANG, F.; YANG, H.; WANG, Y. **Structure characterization of a fucose-containing exopolysaccharide produced by Enterobacter cloacae Z0206.** Carbohydrate Polymers. v. 92, p. 503-509, 2013.

WANG, Y.; LI, C.; LIU, P.; ZAHEER, A.; XIAO, P.; BAI, X. **Physical characterization of exopolysaccharide produced by Lactobacillus plantarum KF5 isolated from Tibet Kefir.** Carbohydrate Polymers. vol, 82. P. 895-903, 2010.

WOICIENCHOWSKY, A. L. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de goma xantana a partir de resíduos agroindustriais e de mandioca.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2001

ZHAO, L.; FAN, F.; WANG, P.; JIANG, X. **Culture medium optimization of a new bacterial extracellular polysaccharide with excellent moisture retention activity.** Appl Microbiol Biotechnol. v. 97 p.2841–2850. 2013.

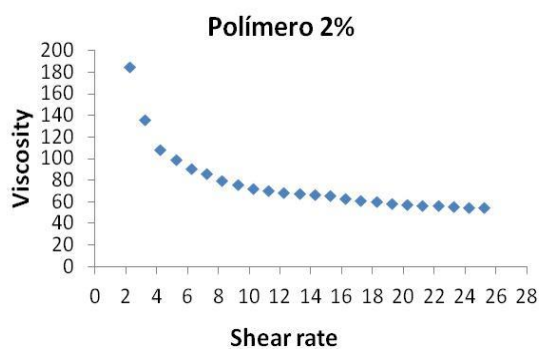
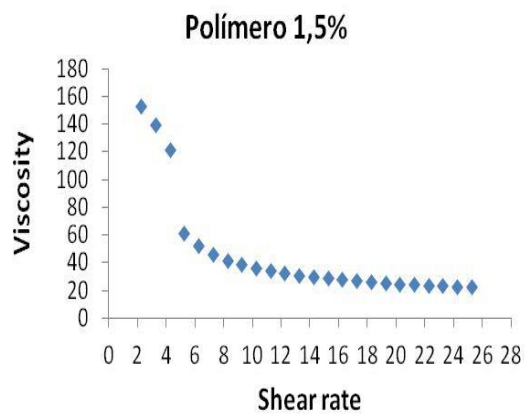
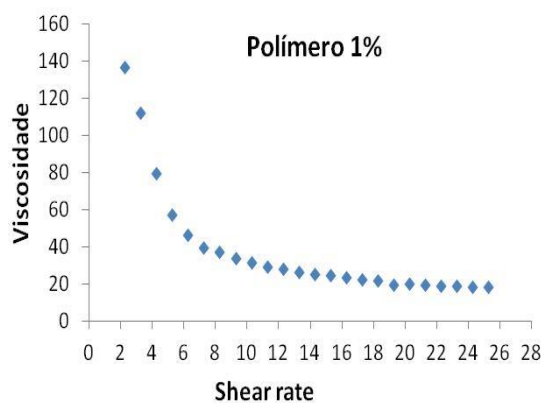
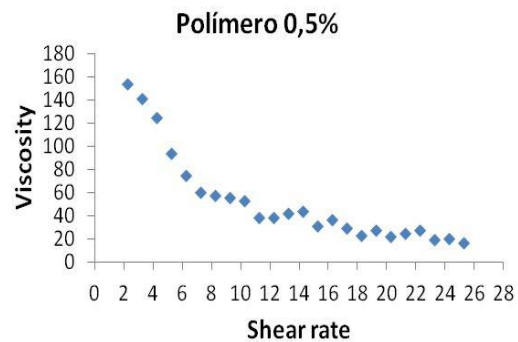
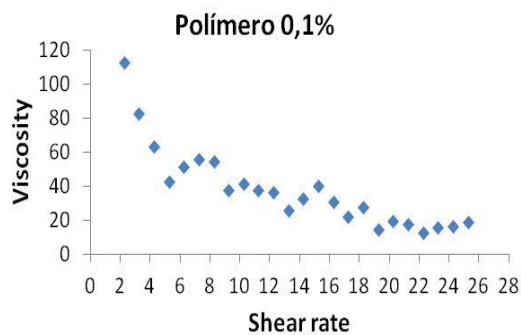
ZOHURIAAN, M.J.; SHOKROLAHI, F. **Thermal studies on natural and modified gums.** Polymer Testing. N.23. p.575–579. 2004.

YANG, S.T. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources. New Technologies and Applications.** ed. Elsevier, p. 684. 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Gráficos de viscosidade com diferentes concentrações (%) polímeros



Condições operacionais da produção do polímero:

Temperatura: 35°C

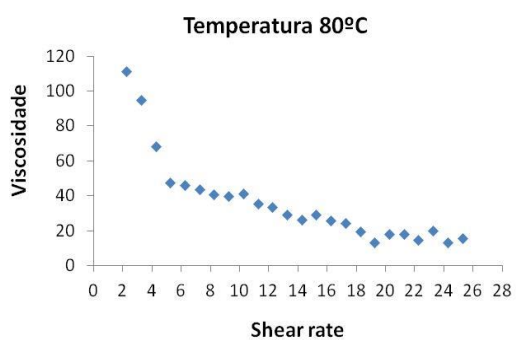
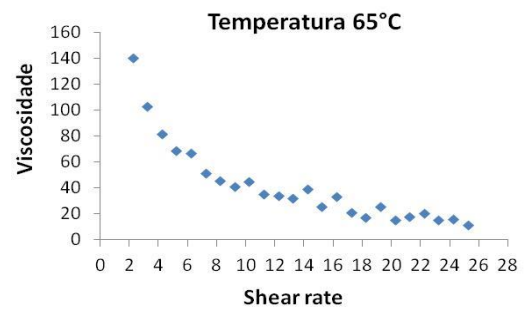
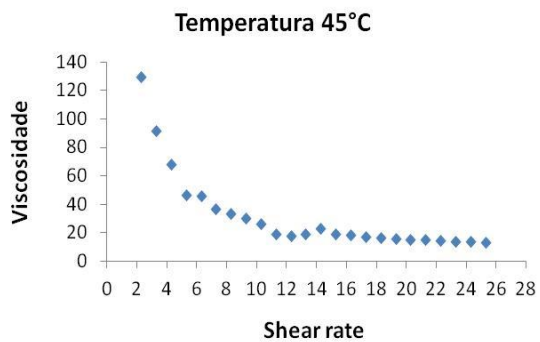
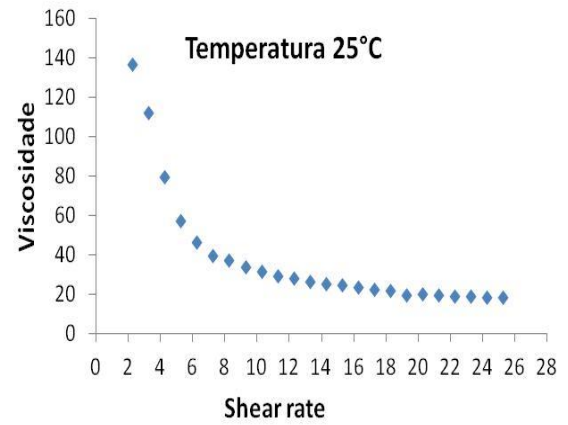
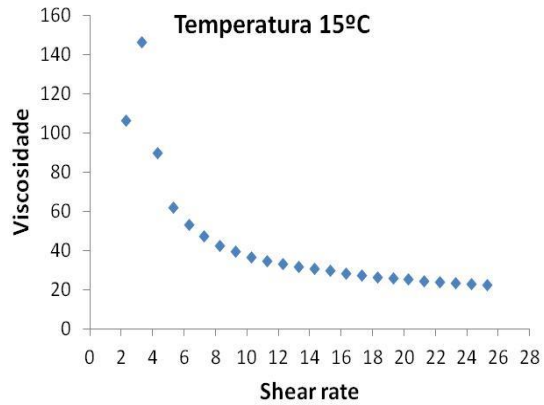
pH: 7,0

Rotação: 240 rpm

Fonte de carbono: 3% de glicerol

APÊNDICE B

Gráficos de viscosidade com diferentes temperaturas



Condições operacionais da produção do polímero:

Temperatura: 35°C

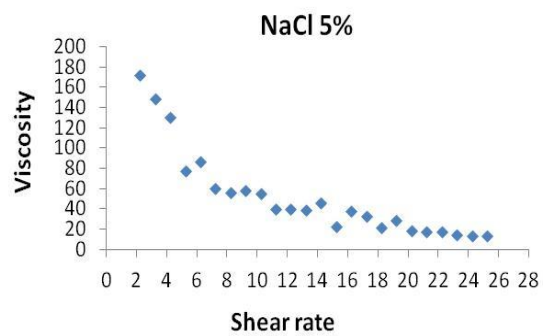
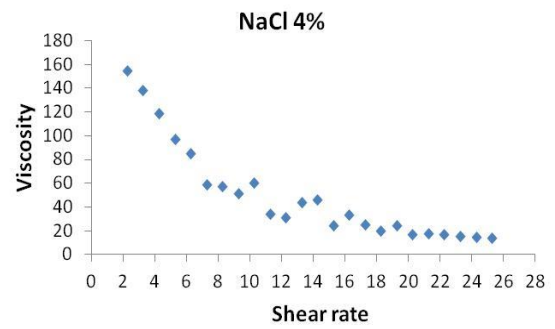
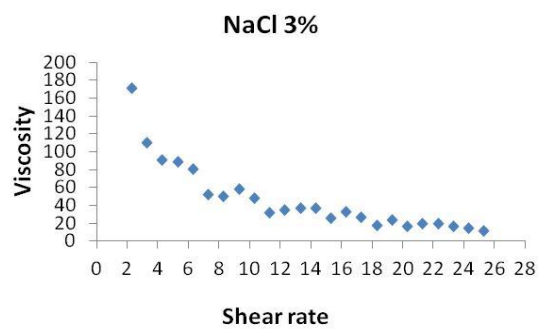
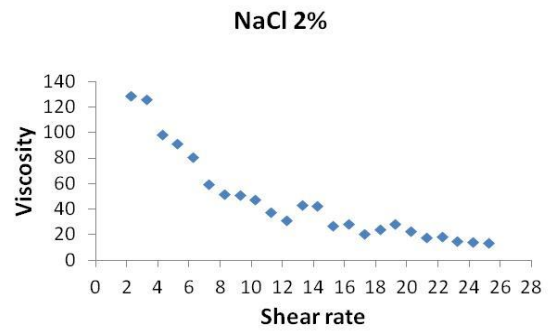
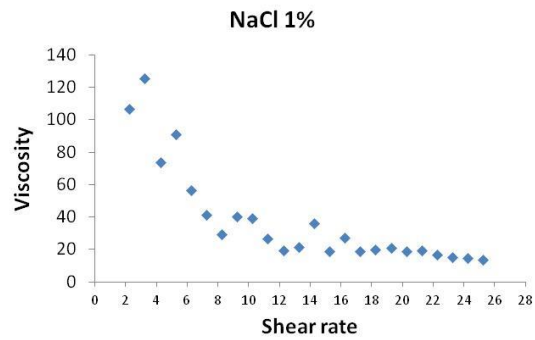
pH: 7,0

Rotação: 240 rpm

Fonte de carbono: 3% de glicerol.

APÊNDICE C

Gráficos de viscosidade com diferentes concentrações de NaCl %



Condições operacionais da produção do polímero:

Temperatura: 35°C

pH: 7,0

Rotação: 240 rpm

Fonte de carbono: 3% de glicerol.

ANEXO

ANEXO A

Tabela de diferenciação do gênero *Enterobacter*.Tabela 01: Differentiation within the genus *Enterobacter*

| Test or property | <i>E. aerogenes</i> | <i>E. agglomerans</i> | <i>E. amnigenus</i> biogroup: | | <i>E. cloacae</i> | <i>E. gergoviae</i> | <i>E. intermedium</i> | <i>E. sakazakii</i> | <i>E. taylorae</i> |
|-------------------------------------|---------------------|-----------------------|-------------------------------|---|-------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|
| | | | 1 | 2 | | | | | |
| Lysine decarboxylase | + ^a | - | - | - | - | + | - | - | - |
| Arginine dihydrolase | - | - | - | v | + | - | - | + | + |
| Ornithine decarboxylase | + | - | v | + | + | + | (+) | + | + |
| Growth in KCN | + | v | + | + | + | - | v | + | + |
| Fermentation of: | | | | | | | | | |
| Sucrose | + | (+) | + | - | + | + | v | + | - |
| Dulcitol | - | (-) | - | - | (-) | - | + | - | - |
| Adonitol | + | - | - | - | (-) | - | - | - | - |
| D-Sorbitol | + | v | - | + | + | - | + | - | - |
| Raffinose | + | v | + | - | + | + | + | + | - |
| α-Methyl-D-glucoside | + | - | v | + | (+) | - | + | + | v |
| D-Arabitol | + | v | - | - | (-) | + | - | - | - |
| Yellow pigment | - | (+) | - | - | - | - | - | + | - |
| Present in human clinical specimens | + | + | - | - | + | + | - | + | + |

Legenda:

+: 90 a 100% positivo

- : negativo (podendo ter reações positiva de até 10%)

(+): 75 a 89% positivo

(-): 10 a 25% positivo

V: 25% a 74,9% positivo