



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA BIOINTERAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ROSEANE VIEIRA MOREIRA

**ESTRATÉGIAS NUTRICIONAIS PARA A OTIMIZAÇÃO DA
PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS PELA
CEPA *Enterobacter amnigenus* LABEM**

Salvador – Ba

2016

ROSEANE VIEIRA MOREIRA

Estratégias nutricionais para a otimização da produção de exopolissacarídeos pela cepa *Enterobacter amnigenus* Labem

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Alexandre Chinalia.

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

Salvador – Ba

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Processamento Técnico, Biblioteca Universitária de Saúde,
Sistema de Bibliotecas da UFBA

M838 Moreira, Roseane Vieira.

Estratégias nutricionais para a otimização da produção de exopolissacarídeos pela cepa *Enterobacter amnigenus* LABEM. / Roseane Vieira Moreira. - Salvador, 2016

66 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Alexandre Chinalia.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Salvador, 2016.

Área de concentração: Biotecnologia Industrial e Imunobiológicos.

Linha de pesquisa: Desenvolvimento de bioprocessos para aplicação industrial.

1. Microbiologia – cultivo e meios de cultura. 2. Biopolímeros. I Chinalia, Fabio Alexandre. II Almeida, Paulo Fernando de. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 604.4

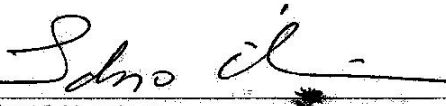
ROSEANE VIEIRA MOREIRA

Estratégias nutricionais para a otimização da produção de
exopolissacarídeos pela cepa *Enterobacter*
amnigenus LABEM

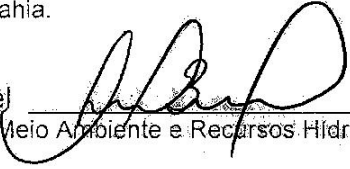
Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da
Bahia.

Aprovada em 28 de julho de 2016.

BANCA EXAMINADORA:

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

Lília Ferreira de Moura Costa 
Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.

Sue Ellen Costa Böttrel 
Doutora em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela Universidade Federal de
Minas Gerais,
UFMG, Brasil.
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

A princípio a Deus pela possibilidade da existência e por ter me dado forças para conquistar esse sonho.

Aos meus pais, Edvaldo e Rosália por acreditarem no meu potencial.

A minha madrinha, Isabel por todo suporte, carinho e apoio.

A minha linda família Moreira, por toda a motivação e pelos bons momentos de descontração.

A toda equipe do Labem e do Moura Costa pelo auxílio no decorrer da pesquisa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Alexandre Chinalia pela incrível orientação e aprendizado no desenvolvimento do trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida pelo acolhimento desde a iniciação científica e por todo o suporte oferecido pelo Labem.

Ao meu tutor Jorge Alberto por ter me escolhido para integrar a equipe do Labem, a Leila por todo treinamento e a todos os doutores, mestres e IC's com os quais tive contato, com vocês aprendi muito.

Aos amigos pesquisadores, destaque especial a Sueli Santos e a Tatiana do Vale por todo aprendizado e apoio, à Bethânia Felix pelo auxílio no planejamento experimental e aos colegas do mestrado: Leonardo, Tamires, Aretha, Marcos, Sara e Camile, por toda a ajuda instrumental, amizade e colaboração.

Ao apoio técnico do Edmundo Lomba e da Débora, com eles a preparação e processamento de material foram realizados de maneira mais ágil.

Aos amigos do Vitória Régia, que se mantiveram presentes dando força e encorajamento e a Nanda, Naira, Edlane e Ágata um abraço especial.

Ao meu noivo, Caio Nascimento por toda a força e por suportar todos os momentos difíceis e estressantes ao meu lado.

A CAPES pela concessão da bolsa.

Enfim a todos que de alguma maneira contribuíram para a concretização desse trabalho, a vitória é nossa!

Tendes fé e coloque sua vontade a
serviço dessa força que tudo que
quiserdes será capaz de realizar.

Um espírito protetor

(Paris, 1963)

MOREIRA, Roseane Vieira **Estratégias nutricionais para a otimização da produção de exopolissacarídeos pela cepa *Enterobacter amnigenus* LABEM.** 66f. il. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

RESUMO

A meta desse trabalho é testar fatores do processo de cultivo que podem diretamente influenciar no rendimento da produção de exopolissacarídeos (EPS) por uma cepa de *Enterobacter amnigenus* LABEM em meio salino. A produção de EPS em meio salino foi pensada para dar suporte a um potencial processo de reutilização *in situ* de água de produção que é gerada durante a recuperação de petróleo em poços maduros situados em plataformas marinhas. Dessa forma o EPS produzido poderia ser utilizado para suplementar a água de injeção, que é também utilizada no processo de recuperação de petróleo. A base do meio, portanto, é a água de produção salina suplementada com uma fonte adicional de carbono para ajudar a sustentar o crescimento microbiano. O glicerol foi testado em um trabalho anterior por ser uma substância de baixo custo e facilmente disponível na indústria do petróleo e de biocombustível. Essa pesquisa dá prosseguimento ao trabalho mencionado e os testes de otimização foram baseados em informações de literatura. Foram escolhidos 6 fatores nutricionais com potencial para influenciar o aumento da produção de EPS: (i) adição de biosurfactante, (ii) adição de etanol, (iii) combinação de etanol e biosurfactante, (iv) complementos de substâncias nitrogenadas orgânicas e inorgânicas como: ácido casamínico, L-aspargina e nitrato de amônio, respectivamente, (v) adição de substância estressante/estimulante como o ácido bórico e (vi) mudanças na relação C:N. Os três primeiros fatores foram testados através da experimentação estatística de “Superfície de Resposta”. Os complementos nutricionais foram testados de acordo com concentrações sugeridas em literatura. A melhor produção de EPS (4,8 g.L⁻¹) aconteceu nas condições de 240 rpm, 35°C e com a suplementação de 0,015% de surfactante e 2% de etanol em pH 7. Esse valor foi 3 vezes maior do que o controle (1,49 g.L⁻¹). As suplementações com ácido bórico, ácido casamínico, L-aspargina e nitrato de amônio apresentaram uma produção média de 2,21; 2,94; 2,46 e 2,63 g.L⁻¹, respectivamente. Portanto, conclui-se que a adição do surfactante e etanol aumentaram significativamente a produção de EPS pela cepa *Enterobacter amnigenus* LABEM em meio salino.

Palavras – chave: Microbiologia – cultura e meios de cultura, biopolímeros.

MOREIRA, Roseane Vieira **Nutricional strategies for optimizing exopolissacharides production by the *Enterobacter amnigenus* strain LABEM.** 66 pp. ill. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

ABSTRACT

The goal of this research is to increase EPS production by the strain *Enterobacter amnigenus* LABEM grown on saline media. The production of EPS in saline media was sought as means to give support the use of “produced water” generated during oil recovery procedures in offshore mature wells. Therefore, saline water supplemented with glycerol was used as the base for the media preparation as reported in previous data. The following optimization experiments were tested (i) the addition of surfactant, (ii) the addition of ethanol, (iii) the combined addition of ethanol and surfactant, (iv) supplementation of organic and inorganic nitrogenised substances such as casaminc acid, L-asparagine and ammonium nitrate, respectively, (v) the addition of stressing/inducing substance such as boric acid and (vi) C:N concentration ratios. The first three variables were tested using the “Surface Response Methodology”. The other variables were tested as suggested in the specialized literature. The best condition for EPS production (4.8 g.L^{-1}) was achieved with 240 rpm, 35°C , 0.015% v/v of surfactant, 2% v/v of ethanol with pH 7. This result was 3 fold higher than what was observed in the control experiment (1.49 g.L^{-1}). Ethanol and surfactant supplementation resulted in higher production performances when compared to the other tests. Boric acid, casaminc acid, L-asparagine and ammonium nitrate resulted in an EPS production of 2.21, 2.94, 2.46, e 2.63 g.L^{-1} . Therefore, there is enough evidence to suggest that ethanol and surfactant amendments can significantly increase the EPS production by *Enterobacter amnigenus* LABEM strain.

Keywords: Microbiology - culture and culture media; biopolymers.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APG - Poliglicosídeo de alquil

CPSs - Polissacarídeos capsulares

C: N - Relação Carbono: Nitrogênio

c-di-GMP - *Cyclic Diguanosine Monofosfato*

CMC - Concentração Micelar Crítica

D.O. - Densidade Ótica

DGC - Adenilato diguanilato

EPS - Exopolissacarídeo

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

LABEM - Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos

MEOR - *Microbial Enhanced Oil Recovery*

NK - *Natural Killer*

OH - Hidroxila

PROÁLCOOL - Programa Nacional do Alcool

PDE - Fosfodiesterase

pH - Potencial Hidrogeniônico

RPM - Rotações por minuto

TSB - *Trypticase Soy Ágar*

UFC - Unidade Formadora de Colônia

% - Porcentagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de vida útil de um reservatório de petróleo.	19
Figura 2	Fluxograma mostrando o design experimental adotado na presente pesquisa.	28
Figura 3	Fluxo laminar organizado para o inóculo	33
Figura 4	Meio de produção no agitador orbital	34
Figura 5	Goma para extração.	36
Figura 6	Goma recuperada.	36
Figura 7	Gráfico de Pareto demonstrando as relações entre as variáveis analisadas com nível de significância de 95%.	40
Figura 8	Produção de EPS por <i>Enterobacter amnigenus</i> LABEM em meio LB	42
Figura 9	Gráfico 3D da Superfície de Resposta da produção de biopolímeros por <i>Enterobacter amnigenus</i> com variação em rotação e concentração de etanol.	43
Figura 10	Gráfico 3D da Superfície de Resposta da produção de biopolímeros por <i>Enterobacter amnigenus</i> LABEM com variação em rotação e concentração de surfactante.	44
Figura 11	Gráfico 3D da Superfície de Resposta da produção de biopolímeros por <i>Enterobacter amnigenus</i> LABEM com variação nas concentrações de etanol e surfactante.	44
Figura 12	Gráfico de Pareto demonstrando as relações entre as variáveis analisadas com nível de significância de 95%.	45
Figura 13	Produção de polímero com adição extra de glicerol e suplementada com ácido bórico.	47
Figura 14	Produção de polímero com suplementação de L-aspargina e etanol.	48
Figura 15	Produção de polímero com suplementação de ácido casamínico e etanol.	49
Figura 16	Produção de polímero com suplementação de nitrato de amônio e etanol.	50
Figura 17	Curva de crescimento da <i>Enterobacter amnigenus</i> LABEM.	51
Figura 18	Produção de polímero com adição de glicerol em diferentes fases	51

	da curva de crescimento de <i>Enterobacter amnigenus</i> LABEM.	
Figura 19	Viscosidade aparente de soluções aquosas com 1% do biopolímero sintetizado por <i>E. amnigenus</i> LABEM com diferentes temperaturas.	52
Figura 20	Viscosidade aparente de soluções aquosas com 1% de EPS sintetizado por <i>E. amnigenus</i> LABEM em diferentes concentrações de NaCl.	53
Figura 21	Espectrometria na região do Infravermelho do polímero sintetizado por <i>Enterobacter amnigenus</i> LABEM.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Aplicações dos principais EPSs microbianos comerciais.	18
Tabela 2	Produtos microbianos e aplicações na recuperação de óleo.	21
Tabela 3	Variáveis e níveis da Metodologia de Superfície de Resposta	29
Tabela 4	Planejamento da Metodologia de Superfície de Resposta. A - Para as variáveis: temperatura, rotação e concentração de surfactante. B – Para as variáveis: temperatura, rotação e concentração de etanol.	30
Tabela 5	Planejamento da Metodologia de Superfície de Resposta para as variáveis rotação e concentração de surfactante e concentração de etanol.	31
Tabela 6	Correspondência das porcentagens utilizadas nos experimentos convertidas para ml.	31
Tabela 7	Listagem de 4 substâncias e suas concentrações, que foram testadas na tentativa de aumentar a produção de EPS por cepa <i>Enterobacter</i> sp. LABEM cultivada em meio salino contendo etanol.	35
Tabela 8	Produção de biopolímero como resposta ao planejamento experimental definido na Tabela 4A.	38
Tabela 9	Análise de variância, estatística ANOVA das melhores produções de polímero após otimização do Superfície de Resposta para as variáveis : temperatura, rotação e surfactante.	39
Tabela 10	Produção de biopolímero como resposta ao planejamento experimental definido na Tabela 4B.	39
Tabela 11	Produção de biopolímero como resposta ao planejamento experimental definido na Tabela 5.	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVO GERAL	16
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1	POLISSACARÍDEOS BACTERIANOS	17
3.2	USO DE POLÍMEROS NA RECUPERAÇÃO AVANÇADA DE PETRÓLEO – MEOR	19
3.3	FUCOPOL	22
3.4	GÊNERO ENTEROBACTER	22
3.5	ESTUDO PRECEDENTE COM A CEPA <i>Enterobacter amnigenus</i> LABEM	23
3.6	LAURIL GLICOSÍDEO	23
3.7	UTILIZAÇÃO DO ETANOL COMO CO-SURFACTANTE	24
3.8	UTILIZAÇÃO DE GLICEROL NO MEIO DE PRODUÇÃO	24
3.9	UTILIZAÇÃO DO MEIO ZOBELL NO MEIO DE PRODUÇÃO	25
3.10	AUMENTANDO A PRODUÇÃO DE EPS	25
3.11	REGULAÇÃO GÊNICA DA PRODUÇÃO DE EPS EM BACTÉRIAS	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	29
4.2	MICROORGANISMO UTILIZADO	32
4.3	ATIVAÇÃO DA CEPA, PRÉ – INÓCULO E INÓCULO	32
4.4	MEIO DE PRODUÇÃO	33
4.5	ESTRATÉGIAS ALTERNATIVAS	35
4.5.1	Adição de substâncias nitrogenadas e estressantes	35
4.5.2	Suplementação orgânica	36
4.6	RECUPERAÇÃO DO POLÍMERO	36
4.7	ANÁLISE DAS PROPRIEDADES REOLÓGICAS	37
4.8	ESPECTROCOSPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER – FTIR	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO	38
5.2	NOVAS ESTRATÉGIAS PARA AVALIAR A PRODUÇÃO DA GOMA BACTERIANA DE <i>Enterobacter amnigenus</i>	46
5.3	CARACTERIZAÇÃO DO POLÍMERO	52
5.3.1	Propriedades reológicas	52
5.3.2	Espectroscopia de Infravermelho	53
6	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	57
	ANEXO	66

1 INTRODUÇÃO

Além da indústria farmacêutica e de alimentos, a indústria do petróleo utiliza - se de significativa quantidade de exopolissacarídeos bacterianos (EPS). Esse produto pode, por exemplo, ser utilizado para viabilizar a recuperação do petróleo que ainda fica retido na formação rochosa de poços maduros (GUDIÑA et al, 2012). O EPS com aplicação para a recuperação de petróleo pode ter várias origens, mas, comumente, é utilizado a xantana, um EPS bacteriano de alto valor comercial que é produzido por *Xanthomonas campestris*. Na tentativa de encontrar uma alternativa para a produção de EPS, Santos (2014), relata o isolamento, identificação e caracterização da cinética de produção de EPS por *Enterobacter amnigenus*, que foi uma cepa bacteriana isolada pelo LABEM/UFBA. O trabalho de Santos (2014) demonstrou que a cepa *E. amnigenus* LABEM pode produzir EPS em condições salinas tendo o glicerol bruto como única fonte de carbono. A autora relata que essas condições têm significativo apelo para a indústria do petróleo por potencialmente viabilizar o reuso de dois resíduos de sua atividade: água de produção (água com alta concentração de sais) e glicerol. No entanto, apesar de obter significativa produção de EPS, a autora não teve condições de testar outras estratégias de cultivo a que viessem estimular uma maior produção. Esse trabalho, portanto, é uma continuidade da pesquisa reportada por Santos (2014) com a intenção de testar algumas estratégias de cultivo que venham aumentar o rendimento de produção de EPS por *E. amnigenus* LABEM quando cultivada em meio salino. Portanto, baseado em Lima et al., (2001) as variáveis que afetam a produção de EPS bacteriano são:

- (i) Difusão de oxigênio em processos aeróbios;
- (ii) Relação carbono/nitrogênio no meio de cultivo;
- (iii) A presença de agentes estimulantes e/ou estressantes no meio de cultivo.

A agitação mecânica ou aeração são estratégias utilizadas para aumentar a difusão de oxigênio no processo de cultivo. No entanto, altas taxas de agitação ou fluxos de aeração podem causar dano celular e assim diminuir a produtividade de EPS (BORGES et al., 2008). Galindo e Salcedo (1996) adicionaram surfactante ao meio de cultivo para melhorar a transferência de oxigênio no processo de produção e assim evitaram ter que aumentar muito a agitação mecânica. Os referidos autores reportam um aumento de 20% na produção de EPS com a adição de surfactante. Esse mesmo efeito foi também observado por Arockiasamy e

Banik (2008). Donot et al (2012), por outro lado, relatam também o aumento da produção de biopolímero com a adição de etanol. É possível que, além de ser uma fonte adicional de carbono, essa adição auxilie também na difusão de oxigênio no meio, uma vez que o etanol, assim como o surfactante, também reduz a tensão interfacial água-atmosfera. Portanto, além de servir como fonte adicional de carbono, a combinação de surfactante e etanol pode alterar a difusão de oxigênio e assim melhorar a produção de EPS.

Fontes adicionais de carbono, nitrogênio e/ou substâncias estressantes são também reportadas em literatura como estratégias para aumentar a produção de EPS (CHOWDHURY et al, 2011; SARIMILSER et al., 2015; TORRES et al., 2014). As fontes de carbono mais comumente utilizadas são açúcares simples, embora vários sejam os testes com substâncias de rejeito, sendo esta última prática uma tentativa de valorização desses produtos (MENEZES et al., 2012; SILVA, MACK E CONTIERO, 2009; TAN et al., 2013). As fontes adicionais de carbono são utilizadas na tentativa de aumentar a produção de biomassa e o acúmulo de EPS. Por outro lado, as diferentes fontes de nitrogênio podem ser utilizadas para estimular vias metabólicas específicas e interferem com o aumento de produção de EPS. Entre as fontes de nitrogênio mais utilizadas nos testes de produção de EPS estão: L-aspargina e nitrato de amônio (FARIA, 2009; CHOWDHURY et al., 2011). Além de específicas fontes de nitrogênio a relação carbono/nitrogênio pode também influenciar positivamente na produção e acúmulo de EPS no meio de cultivo (TORRES et al., 2014). Portanto, são várias as estratégias de cultivo e preparação de meio que podem ser testadas para assim tentar aumentar a produção de EPS. Por esse motivo a técnica estatística de “Superfície de Resposta” tem sido indicada para realizar testes de combinação dessas variáveis (RODRIGUES e IEMMA, 2009; TORRES et al., 2012).

De uma forma geral essa pesquisa baseia-se nas seguintes hipóteses relacionadas à produção de EPS por *Enterobacter amnigenus*:

- (i) A adição de compostos como etanol e/ou biosurfactante podem aumentar a produção de EPS de *E. amnigenus* LABEM pelos seguintes mecanismos:
 - a. Melhora o processo de aeração do meio de cultivo;
 - b. Estimula ou estressa a célula aumentando assim a produção de EPS;
 - c. Serve como fonte de carbono adicional ao crescimento microbiano.

- (ii) Fontes adicionais de nitrogênio podem estimular a produção de EPS por *E. amnigenus* LABEM.
- (iii) A adição tardia de fontes adicionais de carbono durante o processo de cultivo pode alterar a relação C:N e conseqüentemente aumentar a produção de EPSs por *Enterobacter amnigenus* LABEM;
- (iv) A adição de agentes estressantes como ácido bórico pode aumentar a produção de EPS por *E.amnigenus* LABEM.

2 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito da adição de etanol, biosurfactante (lauril glicosídeo) e fontes de nitrogênio como estratégias para aumentar o rendimento de produção do biopolímero da cepa *Enterobacter amnigenus* LABEM.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir a melhor concentração de: etanol, surfactante, e da combinação de etanol e biosurfactante no meio de produção utilizado para a produção biopolímero produzido por *Enterobacter amnigenus* em meio salino;
- Observar se ocorre o estímulo da produção de EPS com as estratégias de adição de fonte de carbono no meio de cultura no final da fase exponencial de crescimento microbiano, ou a adição de agente estressante ácido bórico;
- Observar a mudança da proporção C:N com a adição de diferentes fontes de nitrogênio no meio de cultura.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 POLISSACARÍDEOS BACTERIANOS

A habilidade de produzir polissacarídeos existe em uma gama de organismos, tais quais: plantas, animais, algas, bactérias e fungos. Também denominados polímeros, biopolímeros ou gomas, esses são compostos formados por unidades repetidas de diversos grupos funcionais que compreendem polissacarídeos, poliésteres, poliamidas e polianidridos inorgânicos (MOREIRA, 2002; REHM, 2010). Estes polímeros têm sido usados em detrimento dos exopolissacarídeos produzidos por outros organismos, devido à uniformidade dos seus polímeros, por ser mais fácil de controlar suas condições de produção além da manipulação genética para melhoramento ser muito mais rápida. (LIMA et al., 2001; FREITAS et al., 2014).

A biossíntese destes polissacarídeos bacterianos geralmente ocorre após sua fase de crescimento exponencial e pode ser classificada em três grupos de acordo com a localização na célula em: exopolissacarídeos – EPSs, que são secretados para o meio extracelular; polissacarídeos capsulares – CPSs, que são as substâncias que ficam associadas covalentemente à superfície celular e aos lipopolissacarídeos que são constituintes da parede celular (SUTHERLAND, 1982). Os EPSs podem ainda ser classificados, de acordo com a composição de seus polissacarídeos em dois grupos: (i) homopolissacarídeos e (ii) heteropolissacarídeos, os primeiros são formados por unidades repetidas do mesmo monossacarídeo, por exemplo, a dextrana, e os últimos, constituídos por monossacarídeos diferentes, por exemplo a goma xantana (DONOT, 2012).

Sua gama de aplicações expande-se pelas empresas: alimentícia, farmacêutica, de cosméticos, de recuperação avançada de petróleo, agricultura e ainda na área médica, como exemplificada na Tabela 1.

A produção de EPSs pode também ocorrer em resposta a situações de estresse ou adaptação a ambientes extremos, sendo estes importantes para proteção contra pressões ambientais, que podem incluir variação de temperatura, intensidade luminosa, mudança de pH entre outros (PACE, 1991). Nessas situações as secreções desses compostos compõem

estratégias para sobrevivência da espécie, pois providenciam a formação de biofilmes possibilitando a formação de agregados para aderência e alimentação (POLI et al., 2011).

Os custos de produção de goma (EPS) são elevados por causa do baixo rendimento em relação aos gastos com operação, manutenção e transporte desse produto. Os gastos com a preparação do meio podem alcançar até 50% do custo do produto final (MENEZES et al., 2012). Desta maneira buscam-se novas estratégias de produção a fim de alcançar e/ou superar o baixo rendimento de produção de EPS microbiano. A meta desse trabalho, portanto, também é a de contribuir para a redução dos custos de produção de goma bacteriana que movimenta um mercado de mais de 270 milhões de dólares anuais (MAYER et al., 2008), mas que não é um processo que a indústria brasileira ainda domina. Essa redução possui três vertentes: (i) utilização do glicerol, um resíduo industrial como fonte de carbono; (ii) uso do meio marino Zobell que mimetiza a água do mar tendo como perspectiva o uso da água residual da indústria de petróleo (água de produção) e (iii) utilização de substâncias de baixo custo (etanol e surfactante) como moduladoras do metabolismo microbiano para a produção de EPS. Atualmente, quase a totalidade da goma consumida no Brasil é suprida por importação. Os baixos investimentos em desenvolvimento de processos produtivos mais rentáveis aliados a tecnologia sigilosa patenteada, dificultam a inserção da indústria brasileira neste mercado tão rentável (PRADELLA, 2006).

Tabela 1 Aplicações dos principais EPSs microbianos comerciais

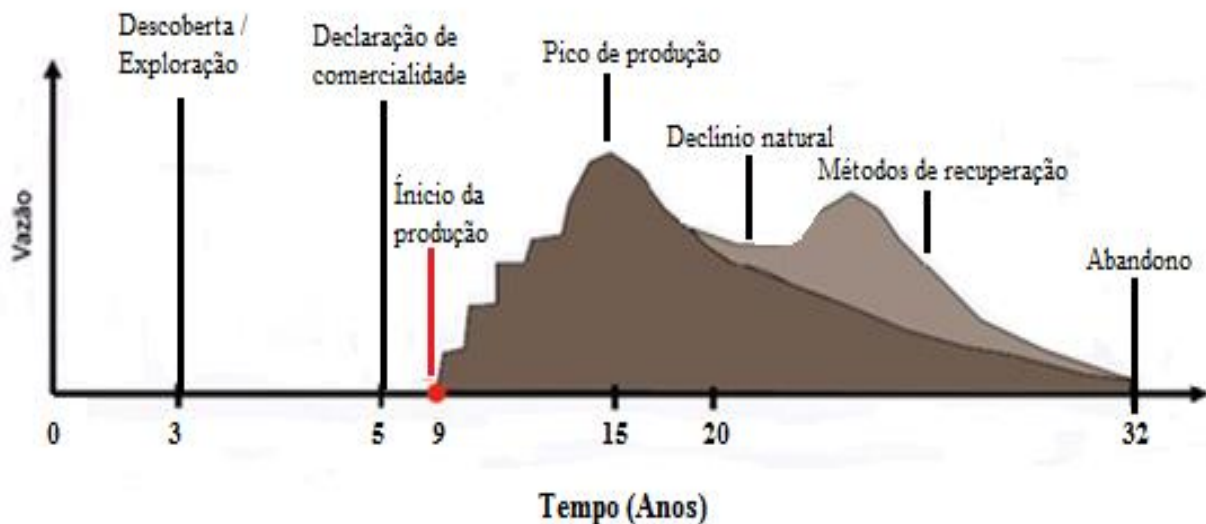
EPS Microbiano	Microrganismo	Aplicação industrial
Xantana	<i>Xanthomonas</i> sp.	Espessante, agente estabilizante, aditivo alimentar
Levana	<i>Halomonas smymensis</i> AAD6, <i>Zymomonas mobilis</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Emulsificante, estabilizante e espessante, agente encapsular, aditivo alimentar, osmoregulador e crioprotetor
Pululana	<i>Aureobasidium pululans</i>	Espessante, estabilizante, agente gelificante
Dextrana	<i>Leuconostoc</i> spp <i>Streptococcus</i> spp	Dilatador de plasma sanguíneo, meio para cromatografia

Fonte: Modificado de ATES, 2015

3.2 USO DE POLÍMEROS NA RECUPERAÇÃO AVANÇADA DE PETRÓLEO – MEOR

Apesar do incremento do uso de tecnologias limpas, que buscam reduzir e/ou eliminar a emissão de poluentes, a sociedade ainda necessita do uso do petróleo e seus derivados. Sendo assim a indústria petrolífera precisa de inovação tecnológica para usufruir plenamente dos recursos de seus poços. O processo desde o descobrimento até o abandono de um reservatório pode ser acompanhado na Figura 1.

Figura 1 – Esquema de vida útil de um reservatório de petróleo



Fonte: Modificado de SAMPAIO (2004)

Brown (2010) e colaboradores relatam que há estimativas que cerca de 2/3 do petróleo ainda fiquem no reservatório após a recuperação primária que consiste no produto da energia natural do próprio reservatório. Na recuperação secundária ocorre a injeção de substâncias, principalmente: água e gás natural, para aumentar a pressão estimulando assim a saída de petróleo. O fator de recuperação está em torno de 45% (BRESSAN, 2009).

Embora quando se fale de exploração de petróleo remeta-se prontamente a águas profundas e ao “pré-sal”, os campos terrestres representem 72% (224 concessões) do total de campos produtores do país (308 concessões), acumulando cerca de 10% das reservas

brasileiras numa área correspondem a 75% das bacias potencialmente produtoras do Brasil (ANP, 2014). No Nordeste, destacam - se o Recôncavo Baiano, Sergipe-Alagoas, norte do Espírito Santo, Sul da Bahia e Rio Grande do Norte onde foram implementados os primeiros poços e hoje estes estão em sua grande maioria abandonados em estado maduro e/ou marginal (SANTOS, 2006).

Campos maduros são aqueles que se encontram em estágio avançado de exploração e para aumentar sua produção necessitam da aplicação de diferentes técnicas de recuperação de petróleo (*Enhanced Oil Recovery* em inglês, EOR), tais quais, injeção de água e/ou de polímeros, surfactantes, álcalis, dentre outras, permitindo assim o deslocamento do óleo e aumentando o fator de recuperação (CARVALHO & CARVALHO, 2012). Muitas dessas substâncias são produzidas por microrganismos. Por exemplo, polímeros como a xantana são produzidos por bactérias do gênero *Xanthomonas* spp (GARCÍA-OCHOA et al., 2000) e vários surfactantes pelo gênero *Bacillus* spp (SARAFZADEH et al., 2014). Nos últimos anos são reportadas várias pesquisas que visam baratear a produção microbiológica dessas substâncias associando a utilização de rejeitos com métodos de cultivo (MENEZES et al., 2012).

Estudam-se também, a aplicação de métodos de recuperação microbiológica avançada de petróleo, técnica mais conhecida em sua sigla em inglês, MEOR - *Microbial Enhanced Oil Recovery*. Essa tecnologia objetiva favorecer que o óleo retido no reservatório seja escoado após a interação com produtos do metabolismo microbiano aumentando assim a sua produtividade em até 30% (ATLAS e BARTHA, 1993).

Na década de 20 foram realizadas as primeiras sugestões do uso de microrganismos e seus derivados para auxiliar o deslocamento de óleo de meios porosos e atualmente a indústria de microbiologia de petróleo aplicada na recuperação avançada de óleo se expandiu bastante com a elucidação de usos, efeitos e aplicações como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Produtos microbianos e aplicações na recuperação de óleo

Produto microbiano	Aplicações
Gases (H ₂ , N ₂ , CH ₄ , CO ₂)	Reduz a viscosidade e melhora as qualidades do produto; Auxilia no deslocamento do óleo imobilizado; Melhoramento do óleo recuperado por gases devido a miscibilidade por gases.
Ácidos (baixo peso molecular)	Melhoramento dos efeitos de permeabilidade e porosidade; Recuperação do óleo inundado.
Solventes (Alcoóis e cetonas - cosurfactantes)	Dissolvem o óleo e reduzem a viscosidade; Aumenta a permeabilidade; Envolvidos na estabilização e redução da tensão interfacial que promove a emulsificação; Emulsificação promovida pelo aumento da miscibilidade.
Biosurfactantes	Reduzem a tensão interfacial; Reduzem a tensão interfacial entre o óleo e a rocha e a superfície da água que age como emulsificante, promovendo o aumento da dimensão do poro; Agem como surfactante microbiano de natureza biodegradável.
Biopolímeros	Aumenta a viscosidade da água na inundação e direciona o fluido da reservatório para áreas previamente não varridas; Aumenta a eficiência do varrimento da inundação pela alta ligação de zonas permeáveis ou zonas invadidas pela água; Controla a mobilidade da água; Modificação da permeabilidade microbiana.
Biomassa (Células microbianas)	Deslocamento físico do óleo pelo aumento da superfície óleo e rocha/superfície da água; Reversão da molhabilidade pelo crescimento bacteriano; Pode ligar pontos de alta permeabilidade; Degradação parcial seletiva de óleo bruto; Age como ligante seletivo e não seletivo na molhabilidade, altera a viscosidade do óleo e desulfatização; Modificação da permeabilidade microbiana.

Fonte: Modificado de LAZAR E YEN (2007).

3.3 FUCOPOL

O fucopol é um exopolissacarídeo composto por fucose (um açúcar de rara comercialização), galactose e ácido glicurônico com resíduos de piruvato, succinato e acetato produzido pela bactéria *Enterobacter amnigenus* cultivada em meio contendo glicerol como fonte de carbono (FERREIRA et al., 2014; TORRES et al., 2015). Este polímero apresenta diversas propriedades tais quais: agente espessante; formador de filmes biodegradáveis; capacidade emulsificante que reduz a tensão superficial e interfacial e que podem ser aplicados em fluido de perfuração de petróleo, tintas, produtos farmacêuticos, cosméticos e produtos alimentícios (FREITAS et al., 2011, 2014). Ferreira et al (2014) estudaram seu uso potencial na indústria de embalagens plásticas e obtiveram um filme durável, com alta alongação e baixa tensão a quebra, propondo a substituição aos filmes convencionais que não são biodegradáveis e causam uma série de problemas ambientais com o seu descarte.

A estrutura do polissacarídeo secretado por essa bactéria foi proposto por Cescutti et al., (2005). Sua composição estimada em porcentagem é de: fucose (32–36 mol%), galactose (25–26 mol%), glicose (28–37 mol%), ácido glicurônico (9–10 mol%) e grupos ácil e succinil (2–3 wt.%), piruvato (13–14 wt.%) e acetil (3–5 wt.%) (TORRES et al., 2015).

3.4 GÊNERO ENTEROBACTER

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 (FARMER et al., 1985). Além disso, diversos EPSs de microrganismos desse gênero já foram descritos com tendo potencial medicinal para atividades anti-carcinogênicas e anti-inflamatórias (HUANG et al., 2015; REUNGSANG et al., 2013; ZHAOA et al., 2015).

A bactéria utilizada neste estudo: *Enterobacter amnigenus* produz uma goma conhecida como fucopol. Essa substância é composta por fucose e possui características distintas de viscosidade em diferentes concentrações de sais e de temperatura (FREITAS et al., 2011; REHM, 2010). Ainda não existe a produção industrial desse biopolímero, mas suas perspectivas comerciais já foram definidas como sendo de alto interesse (BASTOS, 2013).

3.5 ESTUDO PRECEDENTE COM A CEPA *Enterobacter amnigenus* LABEM

Este estudo foi precedido pelo trabalho de Santos (2014). Esse trabalho reporta que foram selecionadas duas cepas pertencentes à Coleção de Culturas do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos (LABEM) identificadas como *Enterobacter* sp. e buscou-se avaliar qual delas seria a melhor produtora de biopolímeros. Para tanto, foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de fontes de carbono, valores de pH e de temperatura. A cepa da espécie *Enterobacter amnigenus*, identificada pelo sequenciamento do 16S rRNA, foi escolhida por ser a melhor produtora de biopolímero em concentrações salinas semelhantes a água do mar (3%), o que a torna favorável para sua utilização na metabolização de resíduos da indústria petrolífera “*off shore*”. A otimização das condições operacionais foi determinada nos seguintes parâmetros: 10% de inóculo, 3% de glicerol a temperatura de 35°C, pH 7,0 e rotação de 240 rpm. E desta forma esses foram os parâmetros utilizados como base inicial para definição do teste de “Superfície de Resposta” realizado nessa pesquisa.

3.6 LAURIL GLICOSÍDEO

Apesar de ter origem sintética, o lauril glicosídeo utilizado nesse trabalho se assemelha quimicamente a surfactantes de origem biológica (biosurfactante) por ter açúcar na sua base estrutural. Esse tipo de surfactante é comumente utilizado pela indústria do petróleo e, portanto, já está disponível em grandes quantidades nos sites onde ocorre a recuperação de óleo (CURBELO, 2006). O uso dessa substância nessa pesquisa está baseado em dados de literatura científica, que identifica sua propriedade em aumentar a produção de EPS (GALINDO e SALCEDO, 1996). Ressalta-se ainda que esses tipos de surfactantes possuem baixa toxicidade, efeitos antibióticos e bioativos, biodegradabilidade e, além disso, são produzidos com recursos renováveis, por exemplo, a partir do milho (KOSARIC e VARZAN-SADAN, 2014).

Destaca-se que os tensoativos são classificados em três grupos principais: tensoativos iônicos, não-iônicos e anfóteros (CURBELO, 2006). Os tensoativos não-iônicos têm propriedades químicas semelhantes com a maioria dos outros tensoativos e suas propriedades são pouco afetadas pelo pH. Estes aspectos combinados aumentam, consideravelmente, as suas possibilidades de aplicação, tornando-os bastante atrativos industrialmente

(SARAFZADEH et al., 2014). O lauril glicosídeo é classificado como um tensoativo não – iônico, de natureza biodegradável com peso molecular acima de 508 Da, compatível com outras classes de surfactantes (NICNAS, 2012).

3.7 UTILIZAÇÃO DO ETANOL COMO CO-SURFACTANTE

O Brasil dispõe de uma grande malha industrial de produção de etanol, incentivada pelo projeto PROÁLCOOL criado em 1979 (BRAY et al, 2000). O etanol foi escolhido como o co-surfactante neste trabalho por ser um dos mais utilizados como veículo em soluções e devido às suas características: de baixa toxicidade; alta biodegradabilidade; ser miscível em água, não possuir potencial carcinogênico e ser de baixo custo (PAAN, 2005).

Como já observado por Zana et al (1981) a adição de etanol e surfactante altera as propriedades da micela promovendo uma maior solubilização do óleo e a adição de etanol reduz o valor da concentração micelar crítica (CMC) permitindo que uma quantidade mínima de surfactante seja suficiente para promoção dos seus efeitos.

3.8 UTILIZAÇÃO DO GLICEROL NO MEIO DE PRODUÇÃO

Enterobacter amnigenus pode utilizar o glicerol, um subproduto da indústria de biodiesel, como fonte de carbono para produção de EPS (SILVA, MACK e CONTIERO, 2009). Essa é uma vantagem para a formulação de um meio de cultivo para a *E. amnigenus* pois, os custos com a preparação do meio podem representar até 50% do custo final do produto (MENEZES et al., 2012). O glicerol apresenta um baixo custo ou valor econômico. Portanto, seu uso como fonte de carbono é uma alternativa para reduzir os custos de produção como já reportado por outros autores (CHANG et al., 2013; JING et al., 2015; SOUZA e SILVEIRA, 2011). Aliando a esse fato, destaca-se que a utilização de resíduos industriais minimiza também problemas ambientais gerados pelo descarte desses resíduos.

3.9 UTILIZAÇÃO DO MEIO ZOBELL NO MEIO DE PRODUÇÃO

A indústria petrolífera utiliza a água do mar como afluyente para a recuperação secundária de petróleo. Atualmente a água residual, rejeito da indústria de petróleo tem obtido atenção dos órgãos reguladores em relação ao seu teor de compostos orgânicos e inorgânicos para sua destinação final, com isso novas tecnologias para seu tratamento e reutilização fazem - se necessários (RAZO-FLORES et al, 2004). A fim de mimetizar a água do mar para a condução padronizada dos experimentos foi utilizado, como meio de produção, o meio salino Zobell (1941). Ele é composto majoritariamente por cloreto de sódio, cloreto de magnésio e sulfato de sódio, tendo como elementos - traço: citrato de ferro, cloreto de potássio, bicarbonato de sódio, ácido bórico, nitrato de amônio, fluoreto de sódio e extrato de carne. Suas devidas proporções estão discriminadas na sessão 4.4 - Meio de produção.

3.10 AUMENTANDO A PRODUÇÃO DE EPS

As estratégias de modulação das condições de cultivo para aumentar a produção de polímeros por micro-organismos têm sido amplamente estudadas (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; ALVES et al., 2010; TORRES et al., 2012 e 2015). Existem várias mudanças nutricionais e operacionais do sistema de cultivo que podem conduzir a um aumento ou diminuição da síntese do polissacarídeo. Observa-se que cada linhagem difere em sua resposta ao efeito dessas mudanças. Destaca-se, por exemplo, a utilização da variação nas concentrações de nutrientes, alterações de condições físicas, presença ou ausência de agitação, quantidade do inóculo e substâncias que compõem o meio, dentre outros fatores (SUTHERLAND, 1990). Devido a essa variabilidade de respostas às condições nutricionais e operacionais do sistema, esse estudo objetivou encontrar uma condição ótima de produção, otimizando primeiro a constituição do meio de cultivo para a partir dessa resposta desenvolver estratégias que possam aumentar a produção do biopolímero produzido por *E. amnigenus* LABEM.

Sendo assim, evidencia - se que as estratégias para o aumento de produção de biopolímeros baseiam-se, principalmente, na mudança de fonte de carbono com a utilização de resíduos industriais; (KALOGIANNIS et al., 2003; MENEZES et al., 2012); modificação na transferência de oxigênio: (GARCÍA-OCHOA et al., 2000), variação nas condições

operacionais tais quais: temperatura, agitação, pH e razão C:N (TORRES et al., 2012; PALANIRA e VIJAYAKUMAR, 2011), dentre outras. Esse trabalho também reporta o uso inovador da combinação de substâncias que promovem a redução da tensão superficial e formação de emulsões como uma tentativa para melhorar a difusão de oxigênio no meio e servir de fonte adicional de carbono para o processo produtivo.

3.11 REGULAÇÃO GÊNICA DA PRODUÇÃO DE EPS EM BACTÉRIAS

Por ser um mecanismo complexo e que envolve várias enzimas, e até mesmo diferentes vias metabólicas, a maioria dos trabalhos que objetivam aumentar a produção de EPS concentram-se nas alterações dos estímulos nutricionais e de operação de cultivo, como os relatados nessa pesquisa. Portanto, essas alterações do processo de cultivo na verdade buscam estimular mudanças metabólicas reguladas por genes específicos do processo de produção de EPS e que estão diretamente relacionados com a disponibilidade de fonte de carbono e variações da concentração de nutrientes (DONOT et al., 2012). Quando as referidas alterações não produzem mudanças significativas na produção de EPS é possível que os reguladores genéticos desse processo estejam defeituosos, inativos ou mesmo ausentes na cepa ou variante em estudo.

Por outro lado, diversas pesquisas vêm sendo realizadas para elucidar a biossíntese e mecanismos genéticos de biossíntese de polissacarídeos bacterianos para possibilitar um melhor controle do aumento de produção. Ates (2015) identifica que a regulação da biossíntese de EPSs está relacionada a processos fisiológicos como:

- (i) Disponibilidade de precursores de açúcares;
- (ii) A grande variabilidade de sinais celulares e ambientais que estabelecem uma sinalização regulatória da produção de EPS;
- (iii) A expressão genética a nível enzimático.

É conhecido, por exemplo, um complexo mecanismo genético que é controlado pelo c-di-GMP (*cyclic diguanosine monofosfato*). Primeiramente essa substância foi descrita como um regulador enzimático alósterico, mas, atualmente já se sabe que essa substância é um segundo mensageiro ubíquo que medeia e estimula múltiplas funções celulares. Além de regular a produção de EPS, por exemplo, essa substância também está envolvida na regulação da formação de biofilmes e adesão celular, *Quorum Sensing*, divisão celular, diferenciação, virulência, estimulação da imunidade inata e indução de células NK (*Natural Killer*) (GUZZO

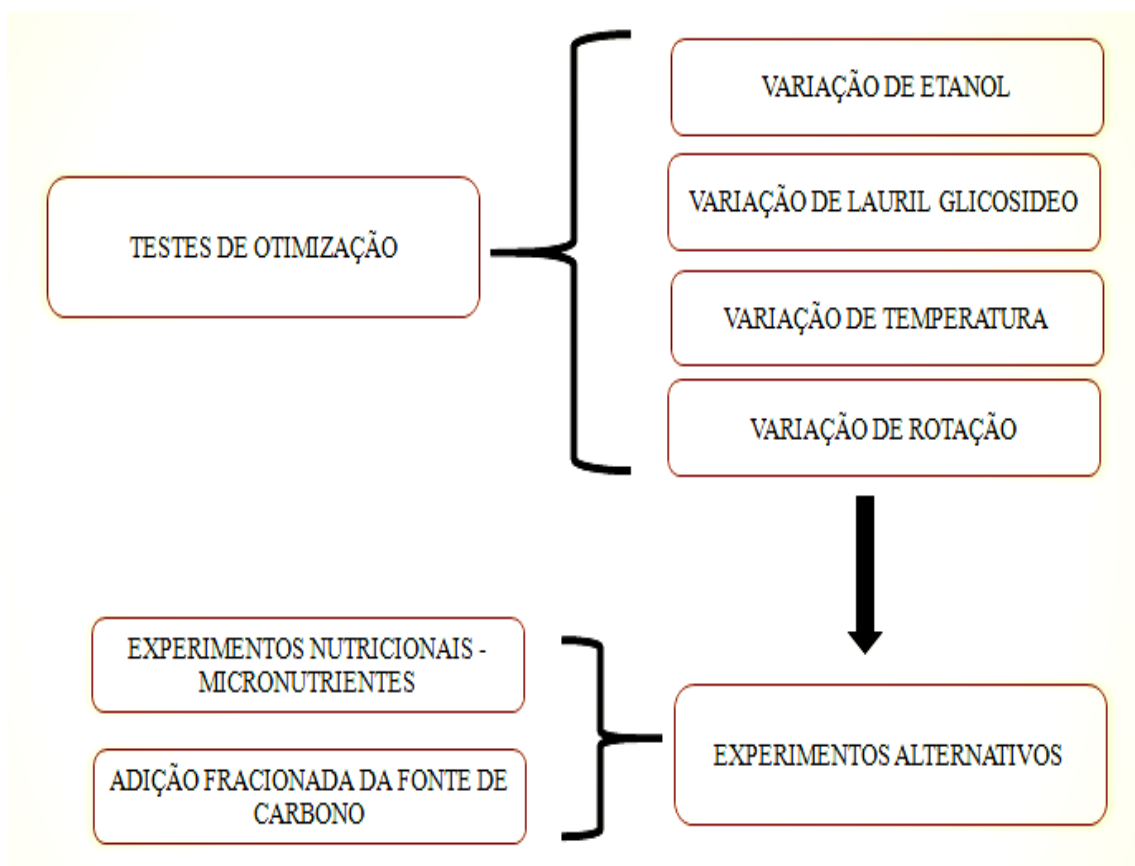
et al., 2013; NAKAMURA et al ; 2015; PÉREZ-MENDOZA et al., 2016). A produção de c-di-GMP também é regulada intracelularmente pela quantidade de adenilato diguanilato (DGCs) e fosfodiesterases (PDE), sendo que a primeira realiza a síntese e última a hidrólise dessa molécula. Acredita-se que mecanismos transcricionais envolvendo a c-di- GMP pode ativar ou reprimir a expressão dos genes regulatórios da glicosil transferase, que é a enzima responsável pela secreção (transporte) e polimerização do EPS extracelularmente (PÉREZ-MENDOZA et al., 2016 ; RAMÍREZ-MATA et al., 2016).

Além das transferases, as enzimas intracelulares envolvidas na produção de EPS são conhecidas como hexoquinases e glicose pirofosfarilases que, intracelularmente, quebram os açúcares e nucleotídeos, preparando para a formação de EPS que, posteriormente, são então transportadas para fora da célula. Essas enzimas participam da via Wzx/Wzy (ATES, 2015). Portanto, o sistema regulador da produção de EPS é extremamente complexo e, até o momento, não é conhecido um único mecanismo que atue no estímulo ou repressão de todo o processo relacionado com a produção bacteriana de EPS. Por esse motivo, a maioria das pesquisas que objetivam aumentar o processo produtivo de EPS são, portanto, ainda baseadas em mudanças nutricionais e/ou características operacionais de cultivo, como o que foi realizado nessa pesquisa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O Fluxograma da Figura 2 mostra o arranjo experimental utilizado nessa pesquisa para testar as alterações nutricionais propostas com o objetivo de aumentar a produção de EPS por *Enterobacter* sp. O fluxograma mostra que foram testados variações nas concentrações de etanol, surfactante, temperatura e de aeração por rotação. Para complementar os dados foram também realizados testes alternativos variando a concentração de nitrogênio e da adição fracionada de fonte de carbono.

Figura 2 – Fluxograma mostrando o design experimental adotado na presente pesquisa.



Fonte: Autoria própria

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental foi baseado no delineamento fatorial auxiliado através da ferramenta computacional conhecida como “Metodologia de Superfície de Resposta”. Essa ferramenta estatística está disponível em vários softwares como MINITAB e Statística. Para que o uso dessa ferramenta de modelagem probabilística de dados seja efetivo é necessário conhecer alguns pontos básicos da técnica. Primeiro é preciso definir uma meta ou propósito, como, por exemplo, a relação entre o aumento da produção de EPS como função da mudança, combinada ou não, de fatores como temperatura e específicas fontes de carbono. A partir da elaboração dessa hipótese é possível montar um planejamento experimental para testá-la.

A meta dessa pesquisa, portanto, foi a de estatisticamente testar combinações nutricionais e condições de cultivo para otimizar a produção de EPS através da realização de um número reduzido de experimentos e repetições, minimizando, assim, o tempo e o custo final dos testes (RODRIGUES e IEMMA, 2009). Portanto, a metodologia foi ajustada para entender a influência combinada das seguintes variáveis operacionais: (i) temperatura e (ii) agitação, (iii) concentrações de surfactante e (iv) concentrações de co-surfactante (etanol) no meio de cultivo. Desta forma, na montagem, foram utilizados 4 níveis e um ponto central e 4 variáveis que estão discriminados na Tabela 3.

Os valores (-1) mínimos, (+ 1) máximos e o ponto central (0) foram preenchidos no programa escolhido (Statística versão 8.0) utilizando valores obtidos a partir de resultados de testes preliminares e/ou mesmo com auxílio de valores reportados em literatura. Os pontos extras para avaliação são gerados pelo programa que testará a probabilidade de interação entre as variáveis escolhidas.

Tabela 3 Variáveis e níveis da Metodologia de Superfície de Resposta.

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura (°C)	26	30	35	40	43
Agitação (rpm)	139	180	240	300	340
Surfactante (%)	0	0,061	0,015	0,239	0,03
Etanol (%)	0,00	0,81	2,00	3,19	4,00

A partir da necessidade de compreender a influência de todas as variáveis na produção do biopolímero foram elaborados primeiramente dois fatoriais completos: 2^3 com 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central como demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4. Planejamento da Metodologia de Superfície de Resposta. A - Para as variáveis: temperatura, rotação e concentração de surfactante. B – Para as variáveis: temperatura, rotação e concentração de etanol.

4 A - Testes	Temperatura (°C)	Rotação (rpm)	Surfactante (%)	4 B - Testes	Temperatura (°C)	Rotação (rpm)	Etanol (%)
1	30	180	0,061	1	30	180	0,81
2	40	180	0,061	2	40	180	0,81
3	30	300	0,061	3	30	300	0,81
4	40	300	0,061	4	40	300	0,81
5	30	180	0,023	5	30	180	3,19
6	40	180	0,023	6	40	180	3,19
7	30	300	0,023	7	30	300	3,19
8	40	300	0,023	8	40	300	3,19
9	26	240	0,015	9	26	240	2,00
10	43	240	0,015	10	43	240	2,00
11	35	139	0,015	11	35	139	2,00
12	35	340	0,015	12	35	340	2,00
13	35	240	0,000	13	35	240	0,00
14	35	240	0,030	14	35	240	4,00
15*	35	240	0,015	15*	35	240	2,00
16*	35	240	0,015	16*	35	240	2,00
17*	35	240	0,015	17*	35	240	2,00

* Ponto central

Após a realização desses dois planejamentos foi realizado um terceiro planejamento que pode ser conferido na Tabela 5, onde foi removida a influência da variação da temperatura, fixando-a em 35°C e considerando dessa vez a estratégia combinada da adição de surfactante e etanol com a variação de agitação.

Tabela 5. Planejamento da Metodologia de Superfície de Resposta para as variáveis rotação e concentração de surfactante e concentração de etanol.

Teste	Rotação (rpm)	Surfactante (%)	Etanol (%)
1	180,00	0,061	0,81
2	300,00	0,061	0,81
3	180,00	0,023	0,81
4	300,00	0,023	0,81
5	180,00	0,061	3,19
6	300,00	0,061	3,19
7	180,00	0,023	3,19
8	300,00	0,023	3,19
9	139,09	0,015	2,00
10	340,91	0,015	2,00
11	240,00	0,000	2,00
12	240,00	0,030	2,00
13	240,00	0,015	0,00
14	240,00	0,015	4,00
15*	240,00	0,015	2,00
16*	240,00	0,015	2,00
17*	240,00	0,015	2,00

* Ponto central

Todos os ensaios foram realizados em duplicata, tendo como variável resposta a produção de polímero. O efeito das variáveis (proporções de condições experimentais e dos suplementos) foi analisado com o auxílio do pacote estatístico Statistica versão 8.0. As concentrações utilizadas nos experimentos foram convertidas de porcentagem (v/v) para concentração e estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Correspondência das porcentagens utilizadas nos experimentos convertidas para ml.

Etanol %	0,81%	2,00%	3,19%	4,00%
Etanol (ml)	0,2025 ml	0,5 ml	0,795 ml	1,00 ml
Surfactante %	0,061%	0,015%	0,024%	0,03%
Surfactante (ml)	0,1525 ml	0,375 ml	0,5975 ml	0,75 ml

4.2 MICRORGANISMO UTILIZADO

A bactéria utilizada foi a cepa *Enterobacter amnigenus* LABEM provenientes da Coleção de Culturas de Microrganismos do ICS - CCMICS pertencentes ao Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos – LABEM. A cepa foi identificada através de sequenciamento utilizando o gene 16S (SANTOS, 2014) e ficam armazenadas à -70°C em um ultra-freezer da marca Thermolectron (2006).

4.3 ATIVAÇÃO DA CEPA, PRÉ – INÓCULO E INÓCULO

Para ativação da cepa, a mesma foi removida do ultra-freezer e armazenada a temperatura de -20°C por 30 minutos e depois a temperatura de 4°C por 20 minutos sendo posteriormente homogeneizada em vortex por alguns segundos.

Para o pré-inóculo houve transferência asséptica de 1000 μL da cultura de *Enterobacter amnigenus* LABEM crioconservada em meio Hogness, previamente descongelada, para erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio TSB – Trypticase Soy Broth, meio nutritivo composto por Caseína pancreática ($17,0 \text{ g.L}^{-1}$), Digerido de soja por papaína ($3,0 \text{ g.L}^{-1}$), Cloreto de sódio ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$); Fosfato dipotássico ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$) e Dextrose ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$), incubado em agitador orbital, *shaker* (Innova, New Brunswik 4080) com agitação de 120 rpm a uma temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24h.

Após esse período houve o preparo do inóculo. Este preparo se deu através da transferência asséptica de 1000 μL de pré-inóculo para erlenmeyers de 250 mL , contendo 50 mL de meio TSB, montagem do fluxo apresentado na Figura 3. O inóculo foi então incubado em agitador orbital, com agitação de 120 rpm, a uma temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, até que fosse atingida a densidade ótica de 2,2 (D.O 560nm) com concentração celular em torno de 10^8 (UFC/mL), em *overnight*.

Figura 3 – Fluxo laminar organizado para o inóculo



Fonte: Autoria própria

4.4 MEIOS DE PRODUÇÃO

A produção do biopolímero sintetizado por *Enterobacter amnigenus* foi realizada em erlenmeyer de 125 ml, contendo 25 mL do Meio Mínimo Mineral Marinho, baseado no meio Zobell, 1941, composto pelos seguintes nutrientes nas seguintes proporções:

Citrato de ferro	0,1g.L ⁻¹
Cloreto de sódio	19,45g.L ⁻¹
Cloreto de magnésio	8,8g.L ⁻¹
Sulfato de sódio	3,24g.L ⁻¹
Cloreto de cálcio	1,8g.L ⁻¹
Cloreto de potássio	0,55g.L ⁻¹
Bicarbonato de sódio	0,16g.L ⁻¹
Acido bórico	0,022g.L ⁻¹
Nitrato de amônio	0,0016g.L ⁻¹
Fosfato de sódio	0,008g.L ⁻¹
Fluoreto de sódio	0,0024g.L ⁻¹
Extrato de carne	0,001g.L ⁻¹
Água destilada	1000 mL ⁻¹

O meio de produção foi também suplementado com 3% (v/v) glicerol como única fonte de carbono e com o tensoativo não- iônico lauril glicosídeo da empresa EMFAL. Esse composto também é identificado como “Sodium Lauryl glucosides Hydroxypropylsulfonate” pela NICNAS (2012). Adicionou – se ao meio, também o co-surfactante etanol.

Posteriormente o meio foi esterilizado por meio de vapor úmido (em autoclave) a temperatura de 121°C por um período de 15 minutos. O meio de produção foi inoculado com 10% (v/v) do inóculo de *Enterobacter amnigenus* LABEM e incubado em agitador orbital, como demonstrado na Figura 4, com as condições operacionais variando em agitação (139, 180, 240, 300 e 340rpm), temperatura (26, 30, 35, 40 e 43°C), concentração de surfactante (0, 0.061, 0.015, 0.024 e 0.03%) e/ou concentrações de etanol (0; 0.81; 2.0; 3.19 e 4.00%), segundo planejamento experimental obtido com o programa Statística e que foi apresentado na sessão do delineamento experimental. O pH inicial foi fixado em 7,0.

Outro meio de produção utilizado foi o Meio E (TORRES, 2014) composto por 3.3g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 5.8g K_2HPO_4 ; 3.7g KH_2PO_4 ; 10 mL de 100 mM MgSO_4 ; 1 mL da solução de micronutrientes composta por 2.78g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1.98g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 2.81g $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.67g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.17g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0.29g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e o meio Luria-Bertani - LB composto por: Triptona, Extrato de Levedura e Cloreto de Sódio (BERTANI, 1951; LURIA e BURROUS, 1957).

Figura 4 – Meio de produção no agitador orbital.



Fonte: Autoria própria

4.5 ESTRATÉGIAS ALTERNATIVAS

Após os testes de otimização do meio orientados pela técnica de Superfície de Resposta conduzidos no programa Statística, foram também realizados dois outros grupos de testes idealizados para averiguar o efeito do uso de diferentes fontes de nitrogênio, distintos valores da razão C:N e de uma substância estressante ao cultivo de *Enterobacter* sp, o ácido bórico como o indicado em literatura especializada (CHOWDHURY et al, 2011; SARILMISER, 2014; TORRES et al., 2014 ; GALINDO E SALCEDO (1996).

4.5.1 Adição de substâncias nitrogenadas e estressantes

A Tabela 7 identifica as diferentes fontes de nitrogênio utilizadas (orgânicas e inorgânicas) e as suas respectivas concentrações que foram adicionadas ao meio de produção contendo 0,81 e 3,19 % (v/v) de etanol, uma vez que essas foram as concentrações de maior produção de EPS identificada pelos resultados dos testes anteriores. A adição de ácido bórico foi testada nas diferentes concentrações indicadas na Tabela 7 e foi utilizado o mesmo meio de produção Zobell.

Tabela 7 Listagem de 4 substâncias e suas concentrações, que foram testadas na tentativa de aumentar a produção de EPS por cepa *Enterobacter* sp LABEM cultivada em meio salino contendo etanol.

Substâncias nitrogenadas	Concentração
Ácido casamínico	0,5 e 1,5 g.L ⁻¹
L-aspargina	0,5 e 1,5 g.L ⁻¹
Nitrato de amônio	0,016 e 0,16 g.L ⁻¹
Substância estressante	Concentração
Ácido bórico	0,22 e 2,2 g.L ⁻¹

4.5.2 Suplementação orgânica

Além da utilização das substâncias nitrogenadas e estressantes, foi também testado a suplementação adicional de fontes de carbono em diferentes momentos do cultivo de *Enterobacter* sp. A estratégia de adição suplementar de fonte de carbono (glicerol) foi realizada em três experimentos distintos:

- (i) Adição de 3% de glicerol após 6 h de cultivo
- (ii) Adição de 1,5% de glicerol às 6 h e novamente às 8 h de cultivo
- (iii) Adição de 3% de glicerol às 8 h de cultivo

4.6 RECUPERAÇÃO DO POLÍMERO

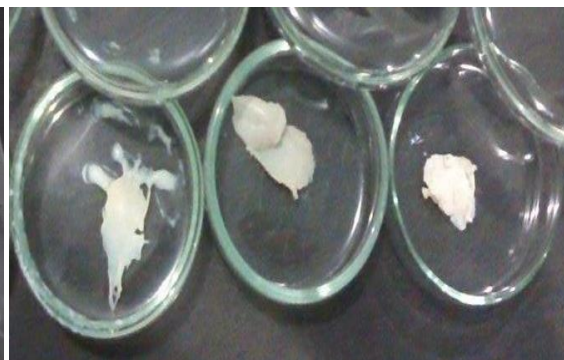
A fim de obter o polímero, após a fermentação de 48 horas o caldo foi transferido para tubos tipo falcon de 50 ml sendo posteriormente centrifugado a 5500 rpm por 40 minutos em centrífuga a 4°C para remoção das células. Em seguida desprezou-se o *pellet* resultante da centrifugação e, assim, o caldo livre de células foi transferido para outro tubo tipo falcon de 50 mL onde foi realizado o procedimento para a recuperação do polímero utilizando a precipitação com etanol na proporção (3 :1, v/v). A mistura foi armazenada sob refrigeração a 4°C por 12 horas. Após a refrigeração a mistura foi centrifugada à 7.000 rpm por 30 minutos em temperatura de 4°C e o biopolímero precipitado foi coletado e reservado em placas de vidro, Figuras 5 e 6, onde foram secos em estufa a 50°C, até obtenção de peso constante.

Figura 5 – Goma para extração



Fonte: Autoria própria

Figura 6 – Goma recuperada



Fonte: Autoria própria

4.7 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES REOLÓGICAS

Para todas estas análises, foi utilizado biopolímero produzido nas condições em: Meio de fermentação Zobell, com 3% de glicerol, em temperatura 35°C, pH 7.0, rotação 240 rpm.

A viscosidade aparente das soluções do biopolímero foi analisada com uma solução de 1% (m/v) da goma macerada, em água deionizada a 25°C. Essas soluções foram agitadas e aquecidas até a total dissolução da goma antes dos testes. Essa amostra foi analisada em reômetro digital Brookfield, modelo LVDV III+, acoplado a um banho-maria. As leituras foram realizadas em intervalos de 10 segundos com variação da taxa de cisalhamento.

Foi também testado o comportamento pseudoplástico do polímero produzido utilizando uma solução de 1% em diferentes temperaturas (15, 25, 45, 65, 80°C) e em diferentes concentrações de NaCl (1% -5%).

4.8 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER – FT-IR

As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr seco e analisadas em equipamento Shimadzu IRAffinity-1 FTIR Spectrophotometer, operando em janela espectral de 400 a 4000 ondas.cm⁻¹. Aproximadamente 1 mg de amostra purificada foi prensada em uma prensa hidráulica (Bovenau, P15 ST) usando um molde (ICL, ICL's Macro/Micro KBr die) e 7 toneladas de pressão. Antes da análise de cada amostra o equipamento foi programado para realizar um espectro de background do ar, sendo este utilizado para eliminar a influência dos componentes do ar no espectrômetro.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização do meio de produção

Os resultados listados na Tabela 8 identificam que, na primeira fase de testes, o valor numérico de melhor produção de EPS ($3,74 \text{ g.L}^{-1}$) foi encontrado na condição de 35°C com a agitação de 240 rpm e suplementação de 0,015% de surfactante. No entanto, apesar de numericamente maior, esse valor não apresenta uma diferença estatística significativa como pode ser observado na ANOVA da Tabela 9, quando comparado com outros tratamentos reportados na Tabela 8. Esse resultado está relacionado com a amplitude da variação da concentração de surfactante utilizada, cujo objetivo foi, nessa etapa, encontrar o melhor intervalo de concentração para estimular a produção de EPS.

Tabela 8 Produção de biopolímero como resposta ao planejamento experimental definido na Tabela 4A

Testes	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Rotação (rpm)	Surfactante (%)	Produção g.L^{-1}
1	30	180	0,061	3,24
2	40	180	0,061	1,92
3	30	300	0,061	2,86
4	40	300	0,061	2,22
5	30	180	0,024	3,68
6	40	180	0,024	2,18
7	30	300	0,024	2,70
8	40	300	0,024	2,02
9	26	240	0,015	2,58
10	43	240	0,015	3,38
11	35	139	0,015	2,62
12	35	340	0,015	2,12
13	35	240	0,000	2,96
14	35	240	0,030	3,08
15*	35	240	0,015	3,74
16*	35	240	0,015	3,28
17*	35	240	0,015	3,52

*Ponto Central

Tabela 9 - Análise de variância, estatística ANOVA das melhores produções de polímero após otimização do Superfície de Resposta para as variáveis : temperatura, rotação e surfactante.

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Teste 1	3	9,72	3,24	0,1024
Teste 5	3	11,04	3,68	0,0144
Teste 10	3	10,14	3,38	0,0004
Teste 15*	3	10,54	3,51	0,0529

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,3176	3	0,105867	2,489028	0,134521	4,066181
Dentro dos grupos	0,3402	8	0,042533			
Total	0,6578	11				

SQ – Soma dos Quadrados, gl – graus de liberdade, MQ – Média quadrática, F – calculado , F crítico – F tabelado

* Média das triplicatas do ponto central

Tabela 10 Produção de biopolímero como resposta ao planejamento experimental definido na Tabela 4B

Testes	Temperatura (°C)	Rotação (rpm)	Etanol (%)	Produção g.L ⁻¹
1	30	180	0,81	3,80
2	40	180	0,81	1,42
3	30	300	0,81	2,52
4	40	300	0,81	1,46
5	30	180	3,19	3,38
6	40	180	3,19	2,34
7	30	300	3,19	2,88
8	40	300	3,19	1,76
9	26	240	2,00	2,84
10	43	240	2,00	2,36
11	35	139	2,00	2,84
12	35	340	2,00	3,06
13	35	240	0,00	2,96
14	35	240	4,00	2,28
15*	35	240	2,00	2,20
16*	35	240	2,00	2,74
17*	35	240	2,00	2,86

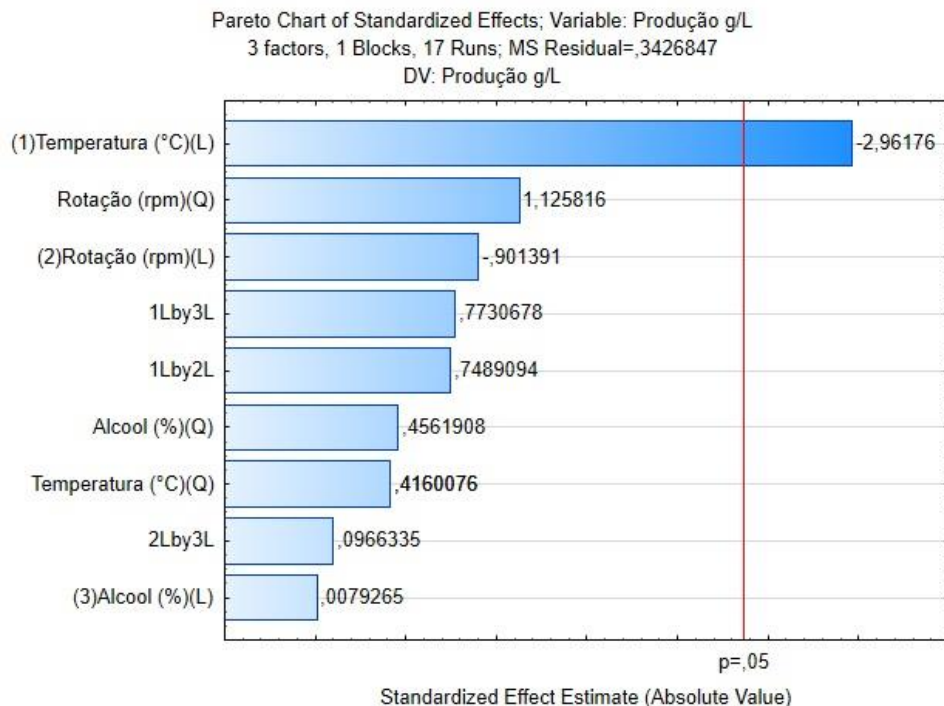
*Ponto central

Como não há diferença estatística entre os grupos, esse resultado sugere que o surfactante pode ser aplicado numa ampla faixa de concentração (0,015 a 0,061%), uma vez que a Concentração Micelar Crítica (CMC) do surfactante lauril glicosídeo está em torno de 150 mg/L do peso total ou 0,015% (VALE, 2015).

Os dados da Tabela 10 mostraram um efeito significativo causado pela variação de temperatura. A temperatura de 30° C e a concentração de etanol de 0,81% foi o tratamento que apresentou a melhor produção de EPS (3,38 e 3,80 g.L⁻¹). Temperaturas de 35° C resultaram em uma produção moderada e, a partir da temperatura de 40°C, observou-se uma diminuição significativa da produção do biopolímero. Com relação a agitação, apenas valores acima de 340 rpm a 35° C causou um pequeno aumento na produção de EPS (Tabela 10). Esse último resultado pode também estar relacionado com um potencial aumento da evaporação do etanol causado pela alta temperatura e agitação.

A análise do gráfico de Pareto (Figura 7) demonstrou que a temperatura foi o único fator que significativamente ($p < 5$) influenciou a produção do polímero nas condições testadas.

Figura 7 – Gráfico de Pareto demonstrando as relações entre as variáveis analisadas com nível de significância de 95%



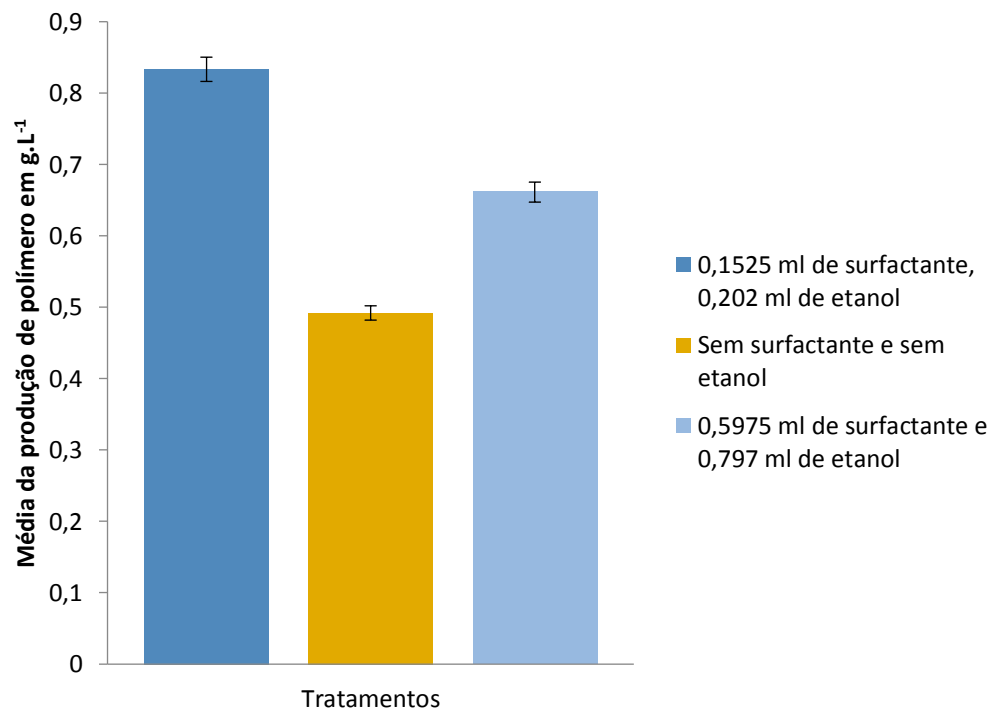
Destaca-se nesse ponto da discussão que as condições ideais para a maior produção de EPS ($7,5 \text{ g.L}^{-1}$) por *Enterobacter* spp foi reportada em literatura por Torres et al. (2012) como sendo de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 180 rpm e 5% de glicerol em meio não salino sem complementação de surfactante ou etanol e em reator de operação contínua. Infelizmente, os autores citados não reportaram a taxa de produção de EPS do sistema impossibilitando fazer uma comparação que levasse em conta o tempo de cultivo. Por outro lado, Santos (2014) reporta que a melhor produção de EPS (5 g.L^{-1}) pela cepa *E. amnigenus* LABEM ocorreu nas condições de 35°C , 240 rpm e 3% de glicerol com 60 horas de cultivo. Portanto, baseado nesses dados, a taxa de produção de EPS nas condições reportadas por Santos (2014) seria, provavelmente, por volta de $0,08 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Nessa pesquisa foi realizado um experimento similar ao reportado por Santos (2014), mas o resultado obtido foi de uma produção de EPS de $1,49 \text{ g.L}^{-1}$ durante a incubação de 48 horas. Portanto, os dados obtidos sugerem uma taxa de produção de EPS de $0,03 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Essa aparente diminuição é deceptiva, pois, a autora supracitada incubou a cultura da cepa *E. amnigenus* LABEM por 60 horas para obter esse resultado e, nessa pesquisa, o período de incubação foi de 48 horas. A diferença na taxa de produção aqui reportada, portanto, indica que, nas condições reportadas por Santos (2014), a referida cepa aumenta o processo de acúmulo de EPS apenas na fase estacionária de crescimento. Portanto, nessa pesquisa, para identificar a melhor condição nutricional capaz de significativamente aumentar a produção de EPS pela cepa *E. amnigenus* LABEM deve-se tomar como base o valor de $1,49 \text{ g.L}^{-1}$ em 48 horas (ou $0,03 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

Na terceira fase de experimento (planejamento 3) a maior produção de EPS foi de $4,8 \text{ g.L}^{-1}$ nas condições de 35°C , 240 rpm com a combinação da adição de 0,015 e 2% de surfactante e etanol em meio salino, respectivamente (Tabela 11). Como o período de incubação foi de 48 horas, a provável taxa de produção foi de $0,1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Esse valor representou um aumento de mais de 3 vezes do que o obtido com o controle experimental, ou seja, sem a suplementação de surfactante e etanol que representou uma produção de $1,49 \text{ g.L}^{-1}$.

Essa pesquisa reporta, portanto, o efeito sinérgico da combinação do uso do surfactante e do etanol para estimular a produção de EPS, como foi também observado por Iglauer (2009) em meio não salino. Acredita-se que o etanol auxilie na redução da tensão interfacial do meio e também melhore a solubilização do surfactante (microemulsão) facilitando a difusão do oxigênio no meio de cultivo. Torres et al. (2011), que também

trabalhou com uma cepa de *Enterobacter* sp, alcançou uma produção de EPS de 7,5 g.L⁻¹, mas, as condições de cultivo reportadas foram de 52 horas de incubação, a 30°C e 150 rpm, utilizando 2% glicerol como fonte de carbono, porém, em meio não salino. A fim de comparar os resultados, a cepa *E. amnigenus* LABEM foi submetida ao mesmo tratamento reportado por Torres et al (2011). Os resultados desse experimento mostram que a cepa *E. amnigenus* LABEM também produz uma quantidade similar de EPS (7,08 g.L⁻¹), mas, em um período menor de incubação (48 horas). Portanto, conclui-se que, em condições não salinas, a cepa *E. amnigenus* LABEM demonstra, se não a mesma, uma melhor capacidade de produção de EPS do que a descrita pelo trabalho de Torres et al (2011). Também para efeito comparativo, a cepa *E. amnigenus* LABEM foi cultivada em meio rico, meio LB para assim avaliar a capacidade da cepa de produzir EPS com uma maior disponibilidade de nutrientes. Os resultados mostraram uma baixa produção de EPS (0,8 g.L⁻¹), Figura 8. Esse resultado evidencia que as condições de estresse e limitação de nutrientes são, portanto, essenciais para o estímulo da produção de EPS pela cepa *Enterobacter amnigenus* LABEM.

Figura 8 Produção de EPS por *Enterobacter amnigenus* LABEM em meio LB



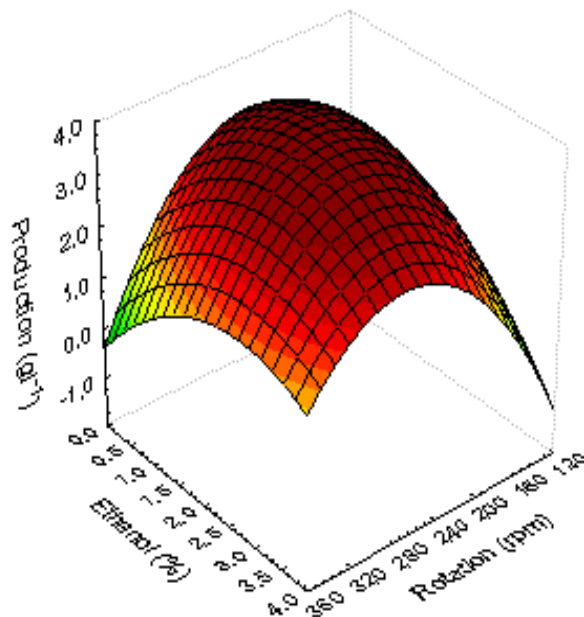
Fonte: Autoria própria

Tabela 11. Produção de biopolímero como resposta ao planejamento experimental definido na Tabela 5

Testes	Rotação (rpm)	Surfactante (%)	Etanol (%)	Produção g.L ⁻¹
1	180,00	0,061	0,81	3,58
2	300,00	0,061	0,81	2,44
3	180,00	0,024	0,81	1,68
4	300,00	0,024	0,81	2,34
5	180,00	0,061	3,19	2,70
6	300,00	0,061	3,19	2,94
7	180,00	0,024	3,19	1,42
8	300,00	0,024	3,19	3,24
9	139,09	0,015	2,00	2,66
10	340,91	0,015	2,00	2,70
11	240,00	0,000	2,00	2,20
12	240,00	0,030	2,00	3,94
13	240,00	0,015	0,00	3,74
14	240,00	0,015	4,00	2,82
15*	240,00	0,015	2,00	4,20
16*	240,00	0,015	2,00	4,44
17*	240,00	0,015	2,00	5,76

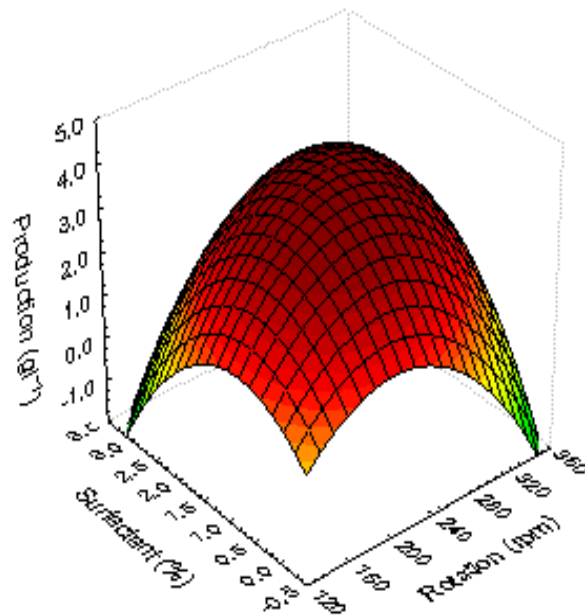
* Ponto central

Figura 9 Gráfico 3D da Superfície de Resposta da produção de biopolímero por *Enterobacter amnigenus* com variação em rotação e concentração de etanol.



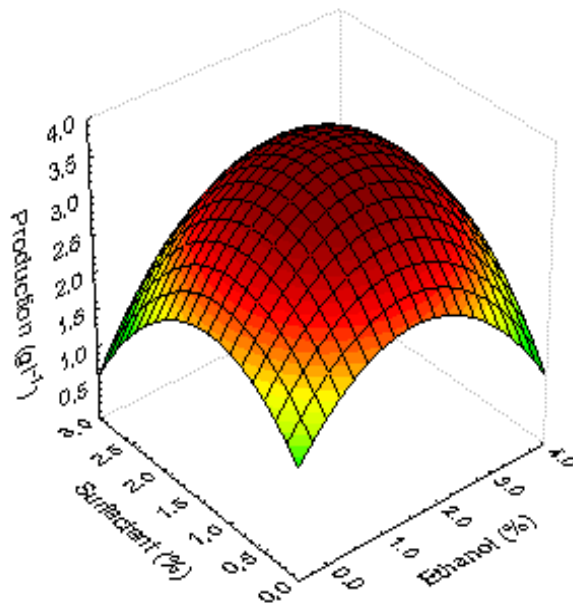
Fonte: Autoria própria

Figura 10 Gráfico 3D da Superfície de Resposta da produção de biopolímero por *Enterobacter amnigenus* com variação em rotação e concentração de surfactante.



Fonte: Autoria própria

Figura 11 Gráfico 3D da Superfície de Resposta da produção de biopolímero por *Enterobacter amnigenus* com variação nas concentrações de etanol e de surfactante.

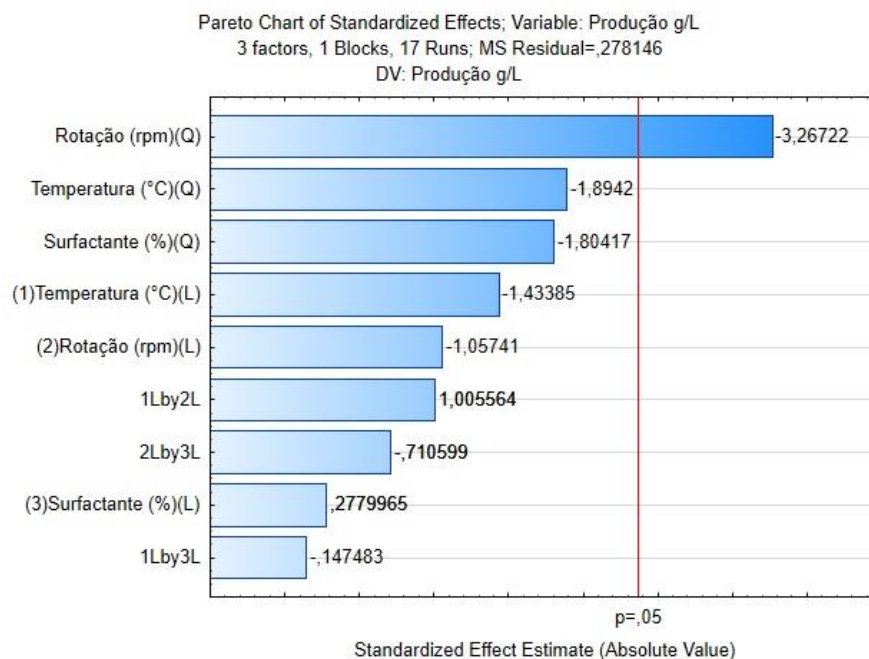


Fonte: Autoria própria

Analisando as condições operacionais do estudo observou-se que rotações acima de 240 rpm, reduzem a produção do biopolímero, como observado na Tabela 11 e na Figura 9. Rotações muito elevadas podem induzir um estresse mecânico que provavelmente destroem as células, o que é explicado por Prasertsan et al (2008).

Nos experimentos onde foi utilizado intervalos de concentrações melhorados por experimentos anteriores a melhor produção de biopolímero ocorreu na concentração de surfactante de 0,015%, com agitação de 240 rpm, como apresentado no gráfico 3D da Figura 10. Porém não houve diferença estatística significativa para a influência do surfactante ao meio de produção, como apresentado no gráfico de Pareto da Figura 12.

Figura 12 – Gráfico de Pareto demonstrando as relações entre as variáveis analisadas com nível de significância de 95%



Já a melhor concentração de etanol que possibilitou a melhor produção de biopolímero situou-se ao redor do valor de 2% (v/v), o que diferiu do seu uso isolado (0,81%) e assim resultou em um aumento na produção de EPS de 1,5 vezes, como demonstrado pelo gráfico da Figura 11.

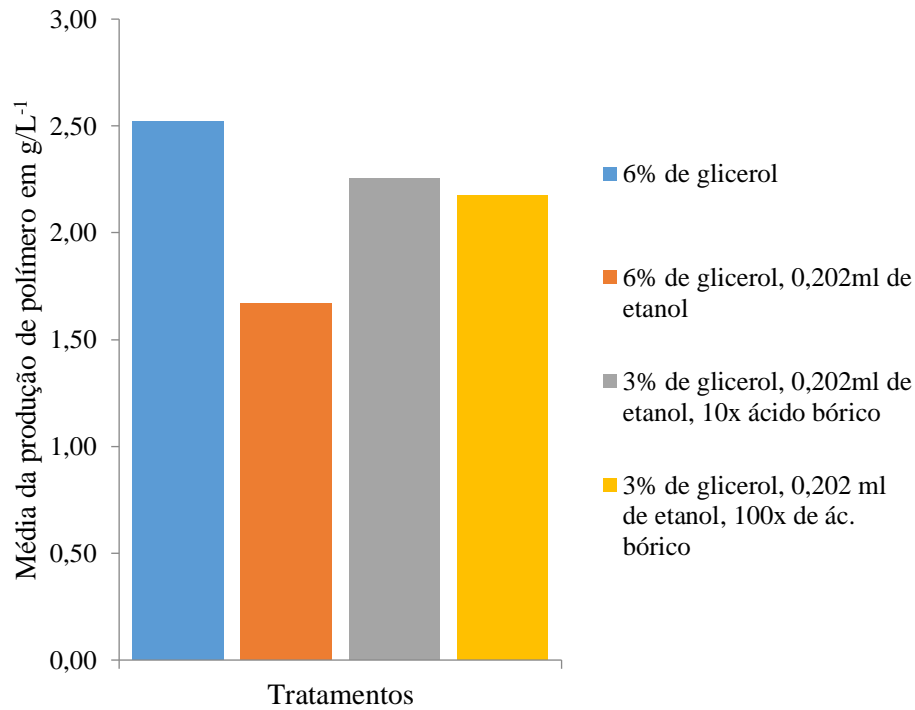
5.2 – ALTERNATIVAS DE CULTIVO PARA AVALIAR A PRODUÇÃO DA GOMA BACTERIANA DE *Enterobacter amnigenus* LABEM

Após a realização dos experimentos para otimização do meio foram elaborados cinco experimentos na tentativa de aumentar ainda mais a produção do polímero. Nesses experimentos foram utilizadas a suplementação com nutrientes, vitaminas ou a introdução da fonte de carbono em momentos diferentes de cultivo. As condições operacionais foram as otimizadas, 240 rpm, pH 7,0 e 35°C. Optou-se pela não utilização do surfactante, para entender mais claramente a ação dos novos compostos utilizados. Em todos os testes foram utilizadas apenas a suplementação de etanol nas concentrações de 0,202 e 0,797 mL.L⁻¹. Intervalo que apresentou os melhores resultados para a produção de EPS.

A primeira estratégia utilizada, portanto, foi baseada na alteração da relação C: N com a adição de glicerol em momentos distintos do cultivo. É reportado em literatura que as alterações da relação C: N pode ser um estímulo para a produção de EPS em espécies bacterianas (ZHAO et al., 2013). A maior disponibilidade de fonte de carbono em relação a fonte de nitrogênio pode estimular algumas bactérias a produzirem EPS como mecanismo de estocagem de carbono para posterior utilização. Nesse experimento observou-se uma produção de 1,67 e 2,52 g.L⁻¹ de EPS com a adição de 6% de glicerol suplementado com 0,202 e 0,797 mL.L⁻¹ de etanol, respectivamente (Figura 13). Os dados indicam um aumento de 1,7 vezes em relação ao valor controle.

Alguns autores descrevem que várias cepas bacterianas podem aumentar a produção de EPS na presença de ácido bórico (EL-TAYEB et al., 2006; SARIMILSER et al., 2014). Estudos com *Halomonas smyrnensis* AAD6 demonstraram um aumento de 5 vezes na produção de EPS. Essa substância tem um papel importante nos mecanismos de estresse e, por isso, na indução do *Quorum Sensing*, mecanismo no qual ocorre maior comunicação entre as células, estimulando assim a produção de EPS (SARILMISER et al., 2015). Nesse experimento foram testadas as concentrações de 0,22 e 2,2g.L⁻¹ de ácido bórico, o que resultou na produção de 2,25 e 2,17 g.L⁻¹ de EPS em meio suplementado com 0,202 e 0,797 mL.L⁻¹ de etanol, respectivamente (Figura 13). Os dados indicam um aumento de 1,5 vezes em relação ao valor controle.

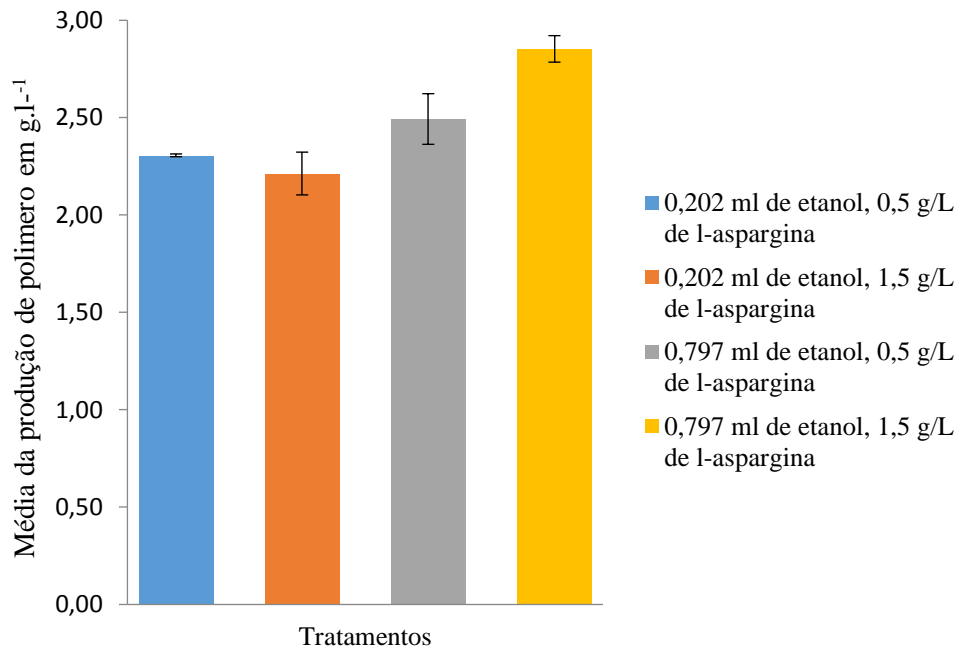
Figura 13- Produção de polímero com adição extra de glicerol e suplementação de ácido bórico



Fonte: Autoria própria

A terceira estratégia foi a suplementação do meio de cultura com L-aspargina, um aminoácido que é habitualmente utilizado na composição de meios de cultura e que pode estimular a produção de polímeros. Por exemplo, Chowdhury et al (2011) reporta um aumento de 20% na produção de EPS por *Streptococcus thermophilus* com a adição desse aminoácido. Foram adicionadas 4 concentrações distintas de L-aspargina e a média de produção foi de aproximadamente 2,5 g.L⁻¹, a maior produção encontrada foi de 2,85 g.L⁻¹ com 0,797 ml de etanol e 1,5 g.L⁻¹ de L-aspargina, demonstrados na Figura 14. Esses resultados, apesar de discretos, representaram o mesmo aumento de 20% reportado por Chowdhury et al (2011).

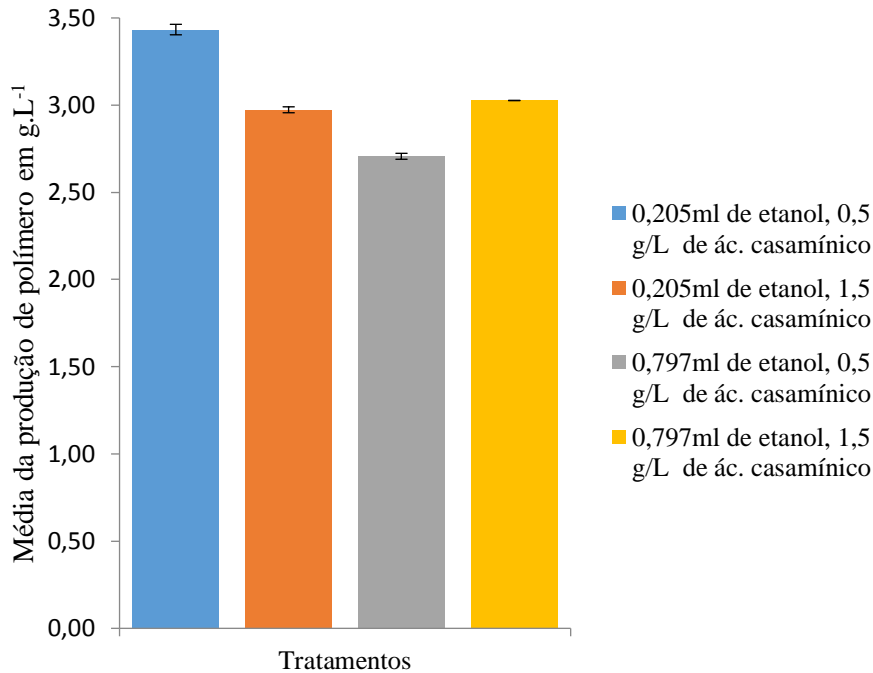
Figura 14- Produção de polímero com suplementação de L-aspargina e etanol



Fonte: Autoria própria

Chowdhury et al (2011) ainda analisando a influência de compostos nitrogenados no aumento da produção de EPS reportaram que a adição de 0,5 g.L⁻¹ de ácido casamínico aumentou a produção bacteriana de EPS. Esse resultado foi confirmado nesse experimento como pode ser verificado na Figura 15, onde a suplementação com essa substância resultou na produção de 3,43 g.L⁻¹ com a adição de 0,205 ml de etanol e 0,5 g.L⁻¹ de ácido casamínico, o que ocasionou um aumento de 20% em relação ao controle.

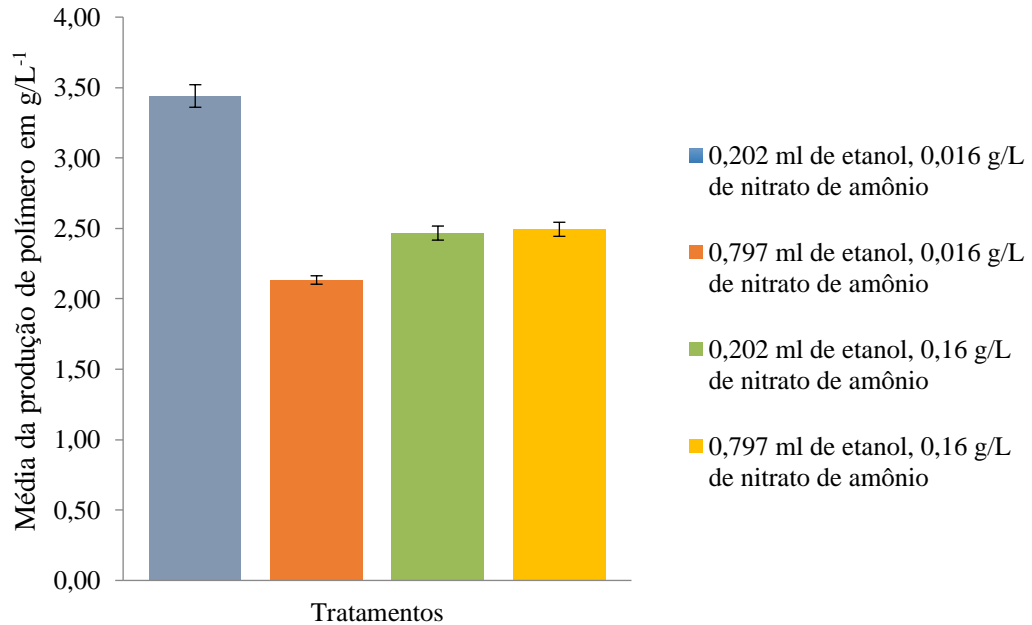
Figura 15- Produção de polímero com suplementação de ácido casamínico e etanol.



Fonte: Autoria própria

Torres et al (2014) reportaram a utilização de nitrogênio e glicerol em diferentes concentrações e momentos da fase de crescimento bacteriano. O aumento da produção de EPS por *Enterobacter* A 47 só foi reportado quando a adição se deu na fase de crescimento da bactéria o que contrariou os resultados aqui encontrados, onde houve o aumento de mais de 2 vezes na produção de EPS pela cepa *Enterobacter amnigenus* LABEM quando foi adicionado 0,016 g.L⁻¹ de nitrato de amônio suplementado com 0,797 ml de etanol ao meio de produção desde o início do processo como representado na Figura 16. Esse resultado pode ter ocorrido pela diferenciação na fonte de nitrogênio ofertada, pela quantidade de nitrogênio ser 40x menor ou pela ação sinérgica do etanol no meio de produção.

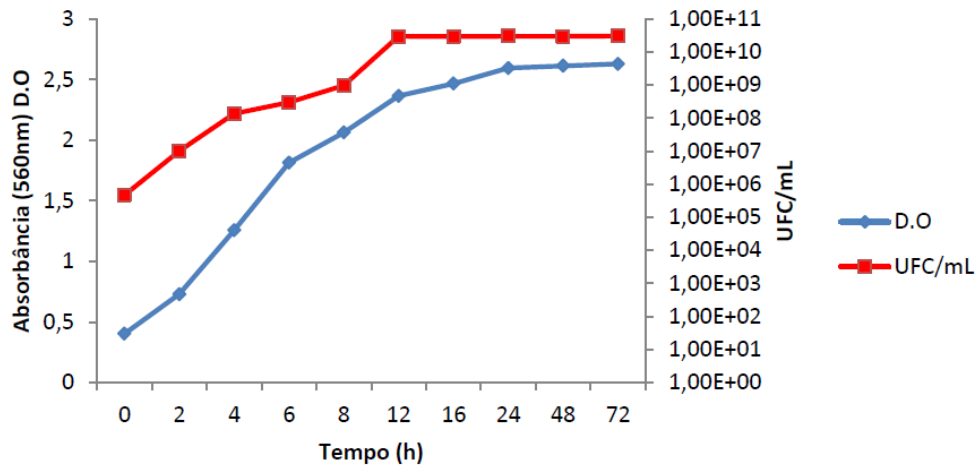
Figura 16 - Produção de polímero com suplementação de nitrato de amônio e etanol.



Fonte: Autoria própria

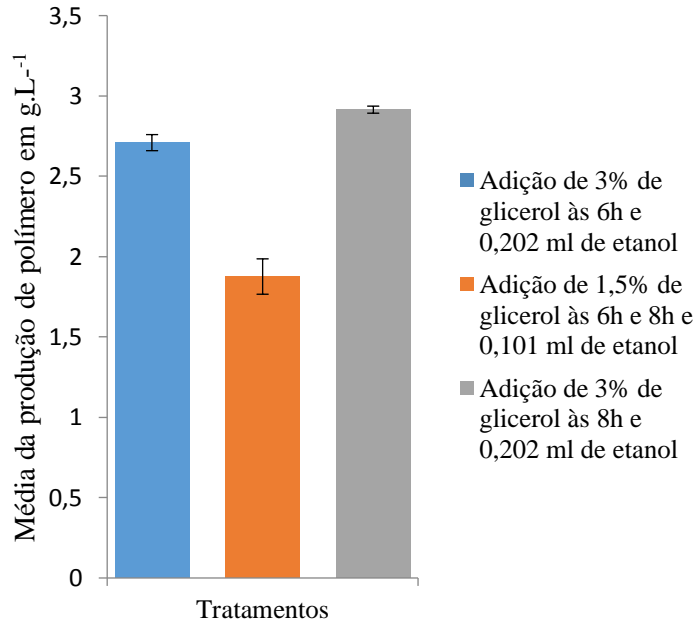
A última estratégia adotada nessa pesquisa foi a adição da fonte de carbono em pulsos durante o cultivo. A Figura 17 resume os dados que identificam as fases de crescimento da cepa utilizada nessa pesquisa. Foi adicionado glicerol em dois intervalos diferentes, como apresentado na Figura 18. No primeiro teste de adição suplementar de glicerol, foi adicionada a quantidade de 3% (v/v) após 6h do inóculo no meio de produção. No segundo teste, foi adicionado 1,5% (v/v) de glicerol após 6h e mais 1,5% duas horas depois. No terceiro teste, foi adicionado 3% de glicerol (v/v) após 8h de cultivo. Essa estratégia foi inspirada no trabalho de Sarilmiser et al. (2015) que objetivou testar alterações na relação C:N durante o cultivo do microrganismo. Esses autores reportaram que a adição de fontes de carbono suplementar logo após o termino da fase exponencial de crescimento altera a relação C:N e conseqüentemente pode aumentar a produção bacteriana de EPS. Com a adição de glicerol após 6hs de cultivo observou-se a produção de 2,7 g.L⁻¹ de EPS. No segundo experimento, observou-se a produção 1.9 g.L⁻¹ e no terceiro a produção foi de 3 g.L⁻¹. Portanto, a adição em 6 e 8h resultou em aumento de aproximadamente 50% no valor de produção de EPS quando suplementado com 0,202 ml de etanol.

Figura 17 – Curva de crescimento da *Enterobacter amnigenus* LABEM



Fonte: SANTOS, 2014

Figura 18 - Produção de polímero com adição de glicerol em diferentes fases da curva de crescimento da *Enterobacter amnigenus* LABEM



Fonte: Autoria própria

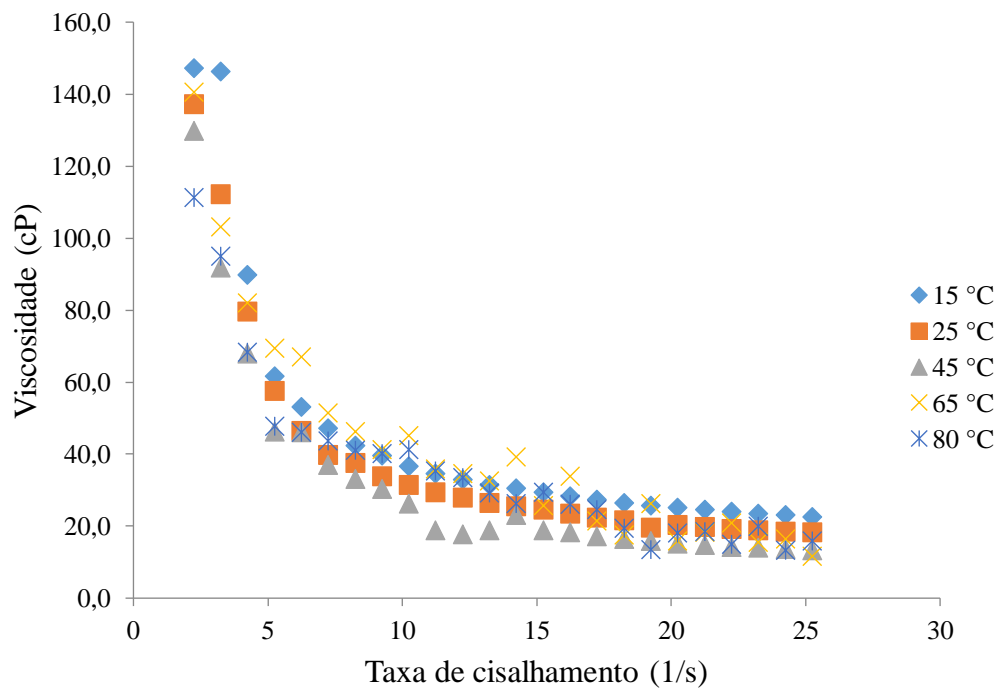
Apesar das estratégias de alteração nutricional não terem levado ao aumento acima dos encontrados na otimização com surfactante e etanol, observaram-se resultados significativos em relação ao controle e que essas substâncias possuem influência positiva sobre a produção de EPS pela cepa *Enterobacter amnigenus* LABEM.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO POLÍMERO

5.3.1 Propriedades reológicas

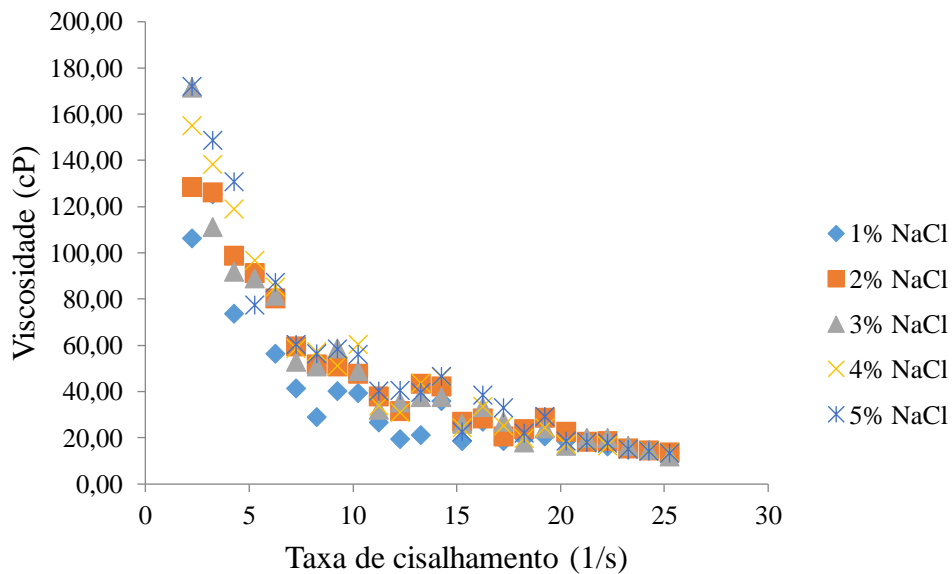
Foram analisadas as características reológicas do polímero produzido por *E. amnigenus* em relação a viscosidade do fluido. Foi medida a viscosidade aparente de soluções aquosas com diferentes concentrações do polímero e com diferentes concentrações de cloreto de sódio em temperaturas variadas, Figuras 19 e 20. Analisando as amostras foi possível conferir o comportamento pseudoplástico em todas as amostras, que é o comportamento típico de polímeros bacterianos, onde a velocidade de deformação não é diretamente proporcional à tensão de cisalhamento (PADILHA et al., 2003). Ou seja, há diminuição da viscosidade aparente com o aumento da tensão sobre o fluido. Esse comportamento também foi encontrado por Alves et al. (2010) analisando o tempo de cultivo no caldo de cultura onde a existência das células bacterianas no caldo não influenciou significativamente para mudanças na reologia do polímero nos primeiros dias de produção.

Figura 19 - Viscosidade aparente de soluções aquosas com 1% do biopolímero sintetizado por *Enterobacter amnigenus* em diferentes temperaturas.



Fonte: Autoria própria

Figura 20- Viscosidade aparente de soluções aquosas com 1% de EPS sintetizado por *Enterobacter amnigenus* em diferentes concentrações de NaCl



Fonte: Autoria própria

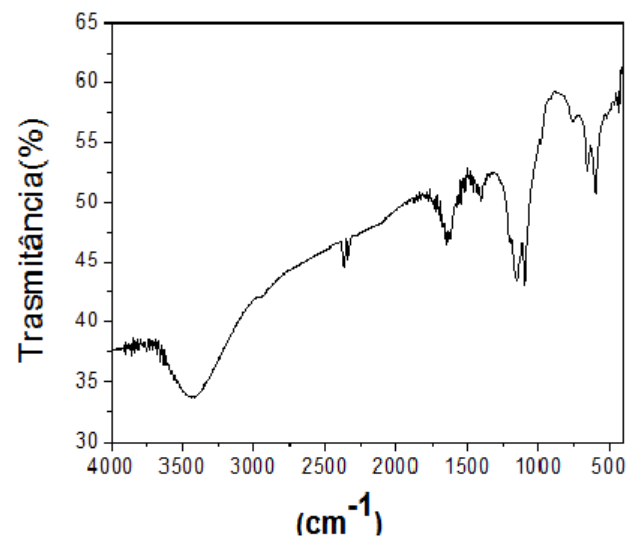
A partir da análise da viscosidade aparente é possível concluir que a goma mantém-se estável a altas temperaturas e com alta concentração de cloreto de sódio, essa estabilidade qualifica esta goma para ser utilizada tanto em poços de petróleo, como na água residual que possui altas concentrações de sais, uma vez que esta essencialmente é proveniente de água do mar.

5.3.2 – Espectroscopia de 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. Analisando o espectro do polímero produzido por *Enterobacter amnigenus*, representado na Figura 21, foi possível observar uma banda na região de 3600 a 3000 (cm^{-1}), indicando 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 680 - 640 (cm^{-1}) é característica da presença de haletos, indicando halogênios cloro e/ou bromo. Esse perfil possui similaridade química ao perfil da goma comercial, goma xantana, denotando assim seu potencial de uso.

Figura 21 - Espectrometria na região do infravermelho do polímero sintetizado por *Enterobacter amnigenus*.



Fonte: Autoria própria

6 CONCLUSÃO

- ✓ A melhor concentração de etanol individualmente utilizada para estimular a produção de EPS ($3,80\text{g.L}^{-1}$) pela cepa de *E. amnigenus* LABEM foi de 0,81% (v/v). Portanto, a adição de etanol pode melhorar significativamente a produção de EPS em meio salino.
- ✓ A melhor concentração de surfactante individualmente utilizada para estimular a produção de EPS ($3,74\text{g.L}^{-1}$) pela cepa de *E. amnigenus* LABEM foi de 0,015% (v/w). Portanto, a adição de surfactante pode melhorar significativamente a produção de EPS em meio salino.
- ✓ A técnica de “Superfície de Resposta” identificou com significância estatística que a melhor condição de produção de EPS pela cepa *E. amnigenus* LABEM ($4,8\text{ g.L}^{-1}$) em meio salino aconteceu nas condições de 35°C , pH 7,0, agitação de 240 rpm, e com a suplementação de 0,015 e 2% de surfactante e etanol, respectivamente.
- ✓ Os resultados sugerem um efeito sinérgico da adição de etanol e biosurfactante no aumento da produção de EPS pela cepa *E. amnigenus* LABEM que partiu de 1,49 para $4,8\text{ g.L}^{-1}$ em 48 horas, portanto, um aumento de mais de 3 vezes. Observa-se também que, quando utilizado em combinação com o surfactante a concentração ótima do etanol mudou de 0,81 para 2%.
- ✓ A produção de EPS pela cepa *E. amnigenus* LABEM é 32% menor em meio salino que o valor obtido em meio não salino.
- ✓ A estratégia de adição de fonte de carbono no meio de cultura no final da fase exponencial de crescimento microbiano (6h; 6 e 8h; e 8h, respectivamente) não resultou em aumento da produção de biopolímero. Portanto, a alteração da razão C:N nessas condições não aumentou significativamente os valores de produção.
- ✓ As suplementações com nitrogênio orgânico, como ácido casamínico e L-aspargina aumentaram a produção de EPS, em relação ao controle, de 2,1 e 1,6 vezes, respectivamente. A suplementação com nitrogênio inorgânico (nitrato de amônio)

resultou em um aumento de 2,3 vezes. Portanto, a suplementação do nitrogênio inorgânico apresentou o melhor resultado.

- ✓ A adição de ácido bórico no meio de cultura resultou em um aumento de produção de EPS em relação ao controle de 1,6 vezes.
- ✓ O polímero produzido por *E. amnigenus* LABEM possui alto potencial de aplicação industrial em termos de seu comportamento reológico em altas salinidades (5% de NaCl) e temperaturas (80°C).
- ✓ A análise da espectroscopia na região de infravermelho demonstrou que o biopolímero possui grupos funcionais semelhantes à da goma comercial xantana.
- ✓ Em termos de inovação a estratégia de utilizar surfactante e etanol determinou a redução de 20% no tempo de produção em meio salino (60 h para 48 h) sem a diminuição do rendimento.

REFERÊNCIAS

ATES, OZLEM Systems Biology of Microbial exopolysaccharides Production Volume 3 **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, p. 1-16, 2015.

ALVES, FERNANDA GERMANO; MOREIRA, ANGELITA DA SILVEIRA; VENDRUSCOLO, CLAIRE TONDO **Influência da Agitação e Aeração na Produção e na Produtividade do Processo de Obtenção de Xantana por *Xanthomonas arboricola* Pv Pruni**. Dissertação (Mestrado em Química) Programa de Pós-Graduação em Química- Universidade Federal de Pelotas, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP: Boletim da Produção de Petróleo e Gás Natural – Circulação Externa, Superintendência de Desenvolvimento e Produção - **Superintendência de Desenvolvimento e Produção - SDP**, nº 58, 2014.

AROCKIASAMY, SANTHIAGU ; BANIK, RATHINDRA MOHAN Optimization of Gellan Gum Production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 with Nonionic Surfactants Using Central Composite **Design Journal of Bioscience and Bioengineering**, p. 204-210, 2008.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology: Fundamentals and Applications**. 3º ed. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. Redwood City, CA, 563p, 1993.

BASTOS, ELSA DE FATIMA SOARES DA SILVA: **Propriedades reológicas e de estabilização de emulsões do fucopol** Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, 2013.

BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 62, p.293-300, 1951.

BORGES, C. D.; MOREIRA, A. DA S.; VENDRUSCOLO, C. T.; AYUB, M. A. Z. Influence of agitation and aeration in xanthan production by *Xanthomonas campestris* pv *pruni* strain 101. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 40, p.81-85, 2008.

BRAY, SILVIO CARLOS; FERREIRA, ENEAS RENTE; RUAS, DAVI GUILHERME GASPAR. **As Políticas da Agroindústria Canavieira e o PROÁLCOOL no Brasil**. Marília/SP: Unesp-Marília, 104p, 2000.

BRESSAN, LIA WEIGERT: **Geoquímica e integridade mineralógica de reservatórios do campo de Buracica para armazenamento geológico de CO₂**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PUCR – Porto Alegre, RS, 2009.

BROWN, R.L. Microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Current opinion in Microbiology**. v.13, p. 316–320, 2010.

CESCUTTI, PAOLA; KALLIOINEN, ANNE; IMPALLOMENI, GIUSEPPE; TOFFANIN, RENATO; POLLESELLO, PIERO LEISOLA, MATTI AND EERIKA INENE, TERO Structure of the exopolysaccharide produced by *Enterobacter amnigenus* **Carbohydrate Research** 340, p. 439–447, 2005.

CURBELO, FABIOLA DIAS DA SILVA- **Recuperação Avançada de petróleo utilizando tensoativos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFRN, 2006.

CHANG; G.F., N.S. GAO, G.W. TIAN, Q.H. WU, M. CHANG, X.G. WANG **Improvement of docosahexaenoic acid production on glycerol by *Schizochytrium* sp. S31 with constantly high oxygen transfer coefficient** *Bioresour. Technol.*, 142, p. 400–406, 2013.

CHOWDHURY, SOUGATA ROY; BASAK, RATAN KUMAR ;SEN,RAMKRISHNA, ADHIKARI, BASUDAM Optimization, dynamics, and enhanced production of a free radical scavenging extracellular polysaccharide (EPS) from hydrodynamic sediment attached *Bacillus megaterium* RB-05 **Carbohydrate Polymers** Volume 86, Issue 3, p. 1327–1335, 2011.

CRUZ, MADALENA; FREITAS, FILOMENA ;TORRES, CRISTIANA A.V. ; REIS, MARIA A.M.; ALVES, VITOR D. Influence of temperature on the rheological behavior of a new fucose-containing bacterial exopolysaccharide **International Journal of Biological Macromolecules** 48, p. 695–699, 2011.

DONOT, F., FONTANA, A., BACCOU, J.C., SCHORR-GALINDO, S: Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction **Carbohydrate Polymers** vol. 87 (2) p. 951-962, 2012.

FARIA, S. **Otimização da produção e caracterização de goma xantana empregando caldo de cana**, (Tese) (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

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.

FERREIRA, ANA R.V. ;TORRES, CRISTIANA A.V. ; FREITAS, FILOMENA ; REIS, MARIA A.M ; ALVES, VITOR D ; COELHO, ISABEL M. : Biodegradable films produced from the bacterial polysaccharide FucoPol **International Journal of Biological Macromolecules** 71, p.111–116, 2014.

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.

FREITAS, F.; ALVES, V.D., A.R. GOUVEIA, C. PINHEIRO; TORRES, C.A., C. GRAND-FILS; REIS M.A.: Controlled production of exopolysaccharides from *Enterobacter*A47 as a function of carbon source with demonstration of their film and emulsifying abilities **Appl. Biochem. Biotechnol** 172(2) p. 641-657, 2014.

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, 2000.

GALINDO, ENRIQUE E SALCEDO, GUADALUPE Detergents improve xanthan yield and polymer quality in cultures of *Xanthomonas campestris* **Enzyme Microb. Technol.**, vol. 19, p.145-149, August, 1996.

GUDIÑA, EDUARDO J.; PEREIRA, JORGE F.B.; RODRIGUES, LÍGIA R., COUTINHO, JOÃO A.P.; TEIXEIRA, JOSÉ A. Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in Microbial Enhanced Oil Recovery **International Biodeterioration & Biodegradation** 68 p.56-64, 2012.

GUZZO, CRISTIANE R; DUNGER, GERMAN ROBERTO; SALINAS, KOPKE; FARAH CHUCK S. Structure of the PilZ–FimXEAL–c-di-GMP Complex Responsible for the Regulation of Bacterial Type IV Pilus Biogenesis **J. Mol. Biol.** 425, p.2174–2197, 2013.

HUANG, MING ; WANG FENGQIN; ZHOU , XIHONG ; YANG, HANGXIAN; WANG YIZHEN Hypoglycemic and hypolipidemic properties of polysaccharides from *Enterobacter cloacae* Z0206 in KKAY mice **Carbohydrate Polymers** Volume 117, 6 March, p. 91–98, 2015.

IGLAUER, STEFAN, WU YONGFU, SHULER, PATRICK, TANG, YONGCHUN, GODDARD, WILLIAM A III Alkyl polyglycoside surfactant–alcohol cosolvent formulations for improved oil recovery **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects** 339 p. 48–59, 2009.

JING, LI LIU ; RUIJIE; CHANG GUIFANG, LI XIANGYU; CHANG MING; LIU YUANFA; JIN QINGZHE ; WANG XINGGUO. A strategy for the highly efficient production of docosahexaenoic acid by *Aurantiochytrium limacinum* SR21 using glucose and glycerol as the mixed carbon sources, **Bioresource Technology**, Volume 177, February, p. 51-57, 2015.

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.

KOSARIC NAIM ; SUKAN, FAZILET VARDAN : Biosurfactants: Production and Utilization—Processes, Technologies, and Economics. **CRC Press**, 389 p, 2014.

LAZAR I. ; YEN I. G. PETRISOR AND T. F. : Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) **Petroleum Science and Technology**, 25, p.1353–1366, 2007.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo, **Edgard Blücher Ltda**, vol.3, 2001.

LURIA, S. E. ; J. W. BURROUS. Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. **J. Bacteriol.** 74 p.461-476, 1957.

MARCHANT, ROGER E BANAT, IBRAHIM M. Microbial biosurfactants : challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology** November, Vol. 30, p. 558–565, 2012.

MAYER L.; VENDRUSCULO C. T.; SILVA W. P.; MOURA A. B. **Produção, propriedades reológicas e composição química da Goma Xantana produzida por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseali***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Curso de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, 2008.

MENEZES, J. D. DE S.; DRUZIAN J. I.; PADILHA F. F.; SOUZA,; R. R. DE. Produção Biotecnológica de Goma Xantana em Alguns Resíduos Agroindustriais, Caracterização e Aplicações **Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental** v(8), nº 8, p. 1761-1776, 2012.

MOREIRA, A. S. **Produção, caracterização e aplicação do biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* PV *pruni***. Pelotas, Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Doutorado em Biotecnologia - Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, (UFPel), 2002.

NATIONAL INDUSTRIAL CHEMICALS NOTIFICATION AND ASSESSMENT SCHEME - NICNAS **Full Public Report EX/178** (STD/1331), 52 p. 2012.

PAAN, PADMA **Effect of alcohol cosolvents on the aqueous solubility of toxaphene**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciências, University of Florida, 2005.

PADILHA, F.F. **Produção de biopolímeros por microorganismos modificados geneticamente**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, 2003.

PACE, G. Polímeros microbianos. In: BU'LOOCK, J.; KRISTIANSEN, B. **Biotecnología Básica**. Traducción: Paloma Liras Padín. Zaragoza: Acribia, p. 449-462, 1991.

PALANIRA, AARTHY; VIJAYAKUMAR, JAYARAMAN, Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* **Journal of Food Engineering** 106, p.1–12, 2011.

PÉREZ-MENDOZA, DANIEL; SANJUÁN, JUAN Exploiting the commons: cyclic diguanylate regulation of bacterial exopolysaccharide production **Current Opinion in Microbiology** 30: p.36–43, 2016.

PRADELLA, J. G. C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos**. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE), Relatório Técnico n.84396-205, Centro de Tecnologia de Processos e Produtos, Laboratório de Biotecnologia Industrial - LBI/CTPP, São Paulo, 119p., 2006.

PRASERTSAN POONSUK., WICHIENTHOT, SANTAD, DOELLE., HORST AND KENNEDY, JOHN F.: Optimization for biopolymer production by *Enterobacter cloacae* WD7 **Carbohydrate Polymers** 71 p. 468–475, 2008.

RAMÍREZ-MATA, ALBERTO; LOPEZ-LARA, LILIA I.; XIQUI-VAZQUEZ, MA LUISA; JIJON-MORENO, SAUL; ROMERO-OSORIO, ANGELICA; BACA, BEATRIZ E. The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense* **Research in Microbiology** 167, p.190-201, 2016.

RAZO-FLORES E; OLGUIN-LORA, P., ALCFINTARA S. AND LBARRIA,M.MORALES Biotreatment of water pollutants from the petroleum industry **Studies in Surface Science and Catalysis** 151, p.513-536, 2004.

REHM BERND H. A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications **Nature Reviews | Microbiology** Volume 8, p.578-592, 2010.

REUNGSANG, ALISSARA; SITTIJUNDA, SUREEWAN; O-THONG, SOMPONG Bio-hydrogen production from glycerol by immobilized *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 on heat-treated UASB granules as affected by organic loading rate international **Journal of Hydrogen Energy** 38, p.6970-6979, 2013.

RODRIGUES, M. I ; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos & otimização de processos.** (2 ed). Campinas: Cárita Editora, 326 p., 2009.

SANTOS JUNIOR, ANABAL. **Produção do petróleo e gás natural em campos de economicidade marginal no Brasil: uma visão pragmática**, 152 f, il. Dissertação (Mestrado em Regulação da Indústria de Energia) - Universidade de Salvador, Programa de Pós Graduação em Energia. Salvador-Ba, 2006.

SANTOS, SUELI CARVALHO DOS. **Produção de biopolímero por *Enterobacter* sp. em condições associadas à utilização de resíduos gerados pela indústria petroquímica.** 100 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

SARAFZADEH, PEGAH, NIAZI, ALI, OBOODI, VAHID, RAVANBAKHS, MOOSA, HEZAVE, ALI ZEINOLABEDINI, AYATOLLAHI, S.SHAHAB, RAEISSI, SONIA : Investigating the efficiency of MEOR processes using *Enterobacter cloacae* and *Bacillus stear other mophilus* SUCPM#14 (biosurfactant - producing strains) in Carbonated Reservoirs **Journal of Petroleum Science and Engineering** 113 p. 46–53, 2014.

SARILMISER, HANDE KAZAK ; ATE, OZLEM ; OZDEMIR ; GONCA, ARGAN; KAZIM YALCIN ; ONER, EBRU TOKSOY Effective stimulating factors for microbial levan production by *Halomonas smyrnensis* AAD6T **Journal of Bioscience and Bioengineering** Vol. 119 No. 4, p.455-463, 2015.

SILVA, GERVÁSIO PAULO DA; MACK, MATTHIAS; CONTIERO, JONAS: Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology **Biotechnology Advances** 27 p. 30–39, 2009.

SOUZA, ANTONIO CARLOS CAETANO DE; SILVEIRA, JOSÉ LUZ Hydrogen production utilizing glycerol from renewable feedstocks—The case of Brazil Renewable and Sustainable **Energy Reviews** 15, p.1835–1850, 2011.

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, 163p. 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.

TORRES, CRISTIANA A.V; MARQUES, RODOLFO; ANTUNES SÍLVIA; ALVES, VÍTOR D; SOUSA, ISABEL; RAMOS AM; OLIVEIRA R; FREITAS, FILOMENA; REIS, MARIA A.M. Kinetics of production and characterization of the fucose-containing exopolysaccharide from *Enterobacter* A47. **Journal Biotechnol.** p.156 – 160, 2011.

TORRES, CRISTIANA A.V ; ANTUNES SÍLVIA; RICARDO, ANA RITA ; GRANDFILS, CHRISTIAN; ALVES, VÍTOR D ; FREITAS, FILOMENA; REIS, MARIA 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.

TORRES, CRISTIANA A.V; MARQUES, RODOLFO; FERREIRA, ANA R.V; ANTUNES SÍLVIA; GRANDFILS, CHRISTIAN; FREITAS, FILOMENA; REIS, MARIA A.M. Impact of glycerol and nitrogen concentration on *Enterobacter* A47 growth and exopolysaccharide production **International Journal of Biological Macromolecules** v.71 p.81–86 83, 2014.

TORRES, CRISTIANA A.V.; FERREIRA, ANA R.V.; FREITAS, FILOMENA; REIS, MARIA A.M., COELHO; SOUSA, ISABEL; ALVES, VÍTOR D. Rheological studies of the fucose-rich exopolysaccharide FucoPol **International Journal of Biological Macromolecules** 79 p. 611–617, 2015.

VALE, TATIANA OLIVEIRA **Potencial de influência do surfactante lauril glicosídeo no metabolismo de BRS e suas implicações nos métodos terciários de recuperação de petróleo.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

ZANA, R., S. YIV, STRAZIELLE, C., LLANOS, P. Effect of alcohol on the properties of micellar systems I. Critical micellization concentration, micelle molecular weight and ionization degree, and solubility of alcohols in micellar solutions. **Journal of colloid and interface science**, v. 80, no. 1, p. 208–223, 1981.

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.

ZHAOA, KE; JIN, MINGLIANG; CHEN, QING; ZHENG, PENG-SHENG Polysaccharides produced by *Enterobacter cloacae* induce apoptosis in cervical cancer cells **International Journal of Biological Macromolecules** 72 p.960–964, 2015.

ZOBELL, C.E.: Studies on marine bacteria. I. The cultural requirement of heterotrophic aerobes. **J. Mar. Res.** 4, p.42-45, 1941.

ANEXO



PLANTAREN 1200

INCI Name: Lauryl Glucoside
 No CAS: 110615-47-9
 Fórmula: S.D
 Peso Molecular: S.D

PROPRIEDADES

É recomendado como um co-surfactantes em xampus, Shower-gel e formulações de espuma de banho, onde a suavidade é necessária.

Quando é usado em conjunto com surfactantes difíceis de espessar como os sulfossuccinatos, ele realça a viscosidade e o aumento de espuma em formulações de baixo poder espumante. Além do mais, aumenta a disposição de polímeros catiónicos das formulações de xampus, que pode melhorar o efeito condicionamento.

INDICAÇÃO

É um poliglucosídeo graxo preparado pela reação de glicose de amido de milho com um álcool graxo natural. É um surfactante não iônico, que não contém solventes. Ele é compatível com outras classes de surfactantes e apresenta excelente biodegradabilidade.

DOSAGEM / CONCENTRAÇÃO USUAL

4,0-12,0%

ARMAZENAMENTO

Em temperatura ambiente, o produto pode parecer não homogêneo, o que não tem efeito negativo na qualidade do mesmo. O produto deve ser aquecido à aproximadamente 45°C, com prévia agitação para o uso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Informe técnico do fabricante.