



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

Rivaldo Cassimiro Júnior

**OTIMIZAÇÃO USANDO ALGORITMOS GENÉTICOS
DE BIODEGRADAÇÃO DE QUEROSENE EM ÁGUA
DO MAR POR *Candida lipolytica* UCP 0988**

Recife
2012

Rivaldo Cassimiro Júnior

**OTIMIZAÇÃO USANDO ALGORITMOS GENÉTICOS
DE BIODEGRADAÇÃO DE QUEROSENE EM ÁGUA
DO MAR POR *Candida lipolytica* UCP 0988**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Modelagem, Simulação e Controle de Processos em Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientadora: Professora Dra. Clarissa Daisy da Costa Albuquerque

Recife

2012

CASSIMIRO JÚNIOR, R.

Otimização Usando Algoritmo Genético de Biodegradação de Querosene em Água do Mar por *Candida lipolytica* UCP 0988, Recife, 2012, 08.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2012.

1. Biodegradação. 2. Modelagem de processos. 3. Computação Bioinspirada.
Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

**OTIMIZAÇÃO USANDO ALGORITMOS GENÉTICOS DE
BIODEGRADAÇÃO DE QUEROSENE EM ÁGUA DO MAR
POR *Candida lipolytica* UCP 0988**

RIVALDO CASSIMIRO JÚNIOR

Examinadores:

Professora Dra. Clarissa Daisy da Costa Albuquerque
(Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Professor Dr. Francisco Madeiro Bernardino Júnior
(Membro Interno)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Professora Dra. Luciana de Oliveira Franco
(Membro Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFPE

Dedico este trabalho a Cláudia, minha esposa;
meus filhos Rafael, Rodrigo e Bruno, e aos meus
pais Janete e Rivaldo; pelo apoio constante.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, meu sustentador, meu guia, minha inspiração. Em Quem deposito minha fé e que, é acima de tudo princípio, meio e fim de todas as coisas.

Aos meus familiares pela confiança constante, o incentivo imprescindível, a compreensão pelas ausências, e em especial minha esposa, na disposição em suprir esta ausência perante os nossos filhos.

A minha orientadora, Professora Dra. Clarissa Daisy da Costa Albuquerque, pela sua capacidade, disposição, dedicação e paciência na transmissão dos conhecimentos científicos e orientação eficaz e estimulante; e ao crédito de confiança depositado a minha pessoa.

A Professora Dra. Alexandra Amorim Salgueiro, coordenadora do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, pelo apoio, presença e confiança permanentes.

Aos demais professores do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais pelo enriquecimento proporcionado em nossas vidas através do conhecimento compartilhado através das aulas e reuniões.

A Jupiranan Ferreira da Silva pelo grande apoio no desenvolvimento da parte experimental deste trabalho.

Aos colegas do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais pelo companheirismo, amizade, e a troca salutar de conhecimentos e experiências.

Aos alunos de graduação da UNICAP, do mestrado e doutorandos da UFPE e RENORBIO pelo apoio nas várias atividades durante nossa jornada no curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

Aos funcionários da Universidade Católica de Pernambuco, em especial os da secretaria e técnicos dos laboratórios, pela atenção e gentileza no atendimento prestado em nossas necessidades durante o curso.

A Universidade Católica de Pernambuco, na pessoa do Sr. Reitor Prof^o Dr. Pe. Pedro Rubens Ferreira Oliveira, S.J. pela oportunidade de participação, em toda plenitude, no Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

À FACEPE, à CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro a projetos desenvolvidos no Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais da UNICAP, que permitiram a obtenção dos dados experimentais usados neste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
CAPITULO I	16
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo Geral	20
2.2. Objetivos Específicos	20
3. REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1. Petróleo e derivados	21
3.2. Querosene	22
3.2.1. Destilação, Composição e Aplicações	22
3.2.2. Caracterização do querosene iluminante	23
3.3. Água do Mar	25
3.4. Poluição do Ambiente Marinho por Petróleo e Derivados	26
3.5. Processos de Remediação	29
3.6. Biorremediação	30
3.7. Biodegradação	31
3.8. Biossurfactantes	32
3.9. Microrganismos Marinhos Degradadores de Hidrocarbonetos	33
3.10. <i>Yarrowia lipolytica</i>	35
3.11. Otimização de Processos de Biodegradação	37

3.12. Metodologia de Superfície de Resposta	38
3.13. Algoritmos Genéticos (AGs)	39
3.13.1. Características Gerais	39
3.13.2. Terminologia	41
3.13.3. Representação da população	42
3.13.4. Função Objetivo	43
3.13.5. Função Aptidão	43
3.13.6. Fluxo básico	44
3.13.7. Inicialização	45
3.13.8. Avaliação	46
3.13.9. Seleção	46
3.13.10. Recombinação	47
3.13.11. Mutação	48
3.13.12. Critério de parada	49
4. REFERÊNCIAS	50
CAPÍTULO II	62
Resumo	63
1. Introdução	64
2. Materiais e Métodos	66
2.1. Microrganismo e Meio de Manutenção	66
2.2. Querosene.....	67
2.3. Água do Mar.....	67
2.4. Ensaio de Biodegradação de Querosene e de produção de Biossurfactante.....	67
2.5. Determinação da Concentração da Biomassa.....	68
2.6. Determinação da Tensão Superficial	68
2.7. Otimização Unirresposta - Abordagem MSR-GD.....	69
2.8. Otimização Unirresposta – Abordagem MSR-AG	70

2.9. Otimização multirresposta – Abordagens MSR-FD e MSR-FD-AG	70
2.10. Ambientes Técnico-Científicos de Desenvolvimento Integrado	72
3. Resultados e discussão.....	72
3.1. Otimização Unirresposta – Abordagem MSR-GD	72
3.1.1. Modelos para concentração de biomassa e tensão superficial	72
3.1.2. Análise e identificação de condição ótima para produção de biomassa	74
3.1.3. Análise e identificação de condição ótima para produção de biossurfactante.	75
3.2. Otimização Unirresposta - Abordagem MSR-AG.....	76
3.2.1. Otimização da concentração de biomassa	77
3.2.2. Otimização da tensão superficial.....	78
3.3. Otimização multirresposta – Abordagens MSR-FD e MSR-AG-FD	80
4. Discussão	82
5. Conclusões	85
REFERÊNCIAS.....	87

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1.	Exemplo de <i>crossover</i> no Algoritmo Genético	48
Figura 2.	Exemplos de métodos de operações de Mutação no Algoritmo Genético (WEISE, 2009)	48

CAPÍTULO II

Figura 1 (a)	Gráfico de Superfície de resposta da concentração de biomassa do modelo ajustado aos dados do planejamento composto central apresentando Interação da concentração de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio	100
Figura 1 (b)	Gráfico de Superfície de resposta da concentração de biomassa do modelo ajustado aos dados do planejamento composto central apresentando Interação da concentração de sulfato de amônio e do pH	101
Figura 1 (c)	Gráfico de Superfície de resposta da concentração de biomassa do modelo ajustado aos dados do planejamento composto central apresentando Interação da concentração de fosfato monobásico de potássio e pH	102
Figura 2 (a)	Gráfico de superfícies de resposta da tensão superficial do modelo ajustado aos dados do planejamento composto central apresentando Interação da concentração de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio	103
Figura 2 (b)	Gráfico de superfícies de resposta da tensão superficial do modelo ajustado aos dados do planejamento composto central apresentando Interação da concentração de sulfato de amônio e do pH	104
Figura 2 (c)	Gráfico de superfícies de resposta da tensão superficial do modelo ajustado aos dados do planejamento composto central apresentando Interação da concentração de fosfato monobásico de potássio e pH ...	105
Figura 3	(a) Melhores valores de Biomassa (aptidão) em cada geração e (b) melhor condição operacional (solução) na geração atual	106
Figura 4	(a) Melhores valores de tensão superficial (aptidão) em cada geração e (b) melhor condição operacional (solução) na geração atual	107

Figura 5	Perfis para os valores previsto da biomassa e desejabilidade: (a) fatores definidos no ponto ótimo, (b) fatores definidos no ponto central (valores) médios.	108
Figura 6	Perfis para os valores previsto da tensão superficial e desejabilidade: (a) fatores definidos no ponto ótimo identificados por AG para biomassa, (b) fatores definidos no vos valores ótimos identificados por AG para a tensão superficial.	109
Figura 7	Compromisso entre produção de biomassa e redução de tensão superficial obtido usando abordagem MSR-FD-AG.	110

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1.	Propriedades físico-químicas do Querosene Iluminante.....	24
Tabela 2.	Terminologia aplicada em Algoritmo Genético X Linguagem Natural	41

CAPÍTULO II

Tabela 1.	Níveis e valores dos fatores do planejamento composto central	93
Tabela 2.	Matriz codificada das variáveis independentes do planejamento central composto e valores observados experimentalmente e previstos por MSR para a concentração de biomassa e a tensão superficial (TS)	94
Tabela 3.	Parâmetros específicos usados nas otimizações baseadas em AG	95
Tabela 4.	Concentrações de biomassa previstas e validadas experimentalmente em condições operacionais ótimas determinadas usando abordagem híbrida MSR – AG	96
Tabela 5.	Condições de meios para degradação de querosene e produção de biossurfactantes por <i>Candida lipolytica</i> UCP 0988 otimizadas para mínima Tensão Superficial (TS) usando abordagem híbrida RMS – AG	97
Tabela 6.	Condições de meios para degradação de querosene e produção de biossurfactantes em água do mar por <i>C.lipolytica</i> UCP 0988 usando diferentes técnicas de otimização	98

LISTA DE ABREVIATURAS

AEs	Algoritmos Evolucionários
AGs	Algoritmos Genéticos
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
DNAr	DNA recombinante
FISPQ	Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico (BR Distribuidora)
HAPs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
IC	Inteligência Coletiva
ICGA	Conferência internacional de Algoritmos Genéticos
LSE	Limite Superior de Ignição
LSI	Limite Inferior de Ignição
NBIC	Sigla atribuída à convergência tecnológico (nanotecnologia, biotecnologia, tecnologia da informação e comunicação, e ciência cognitiva) no ambiente científico.
NP	Nuvem de Partículas
POP	Poluentes orgânicos persistentes
QI	Querosene Iluminante
RNAs	Redes Neurais Artificiais
SH	Substratos Hidrofóbicos
SIA	Sistemas de Inteligência Artificial
SNC	Sistema Nervoso Central
TCC	Temperatura crítica de combustão (Ponto de Fulgor)

RESUMO

Estudos têm comprovado a capacidade de vários microrganismos degradarem petróleo e derivados. Existe um consenso de que este é o principal mecanismo para regeneração do meio ambiente. O processo de biodegradação natural é reconhecido como lento e dependente de condições como pH, temperatura, oxigênio e fontes de carbono, nitrogênio e fósforo. Neste estudo, a biodegradação de querosene e a produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* UCP 0988 foi investigada. Metodologia de superfície de resposta foi utilizada para obter modelos quadráticos para concentração de biomassa e tensão superficial, usando dados de planejamento composto central tendo o pH e as concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio como variáveis independentes e a concentração de biomassa e a tensão superficial como variáveis respostas. Otimização uni e multiresposta baseadas em diferentes abordagens híbridas usando metodologia de superfície de resposta, funções de desejabilidade e algoritmos genéticos foram implementadas para maximizar a concentração de biomassa e/ou minimizar a tensão superficial dos líquidos metabólicos livres de células de levedura. Os resultados obtidos foram validados experimentalmente e mostram que - respeitadas as especificidades e limitações de cada método - as diferentes abordagens podem ser usadas com sucesso para otimizar condições operacionais de meios de biodegradação e produção de biossurfactantes em água do mar, conduzindo a processos de biorremediação mais rápidos e custo-efetivos.

Palavras-Chave: querosene, água do mar, *Candida lipolytica*, biodegradação, otimização, algoritmos genéticos.

ABSTRACT

Studies have proven the ability of various microorganisms degrade petroleum and derivatives. There is a consensus that this is the main mechanism for regeneration of the environment. The natural process of biodegradation is recognized as slow and dependent on conditions such as pH, temperature, oxygen and carbon, nitrogen and phosphorus sources. In this study, the kerosene biodegradation and the biosurfactant production by *Candida lipolytica* UCP 0988 were investigated. Response surface methodology was used to obtain quadratic models for biomass concentration and surface tension, using data of central composite design having pH and concentrations of ammonium sulfate and potassium phosphate monobasic as independent variables and the biomass concentration and surface tension as response variables. Uniresponse and multiresponse optimization based on different hybrid approaches using response surface methodology, desirability functions and genetic algorithms have been implemented to maximize the concentration of biomass and/or minimize the surface tension of the yeast cell-free metabolic liquid. The results were validated experimentally and show that - while complying with the characteristics and limitations of each method - the different approaches can be used successfully to optimize operational conditions of media for kerosene biodegradation and biosurfactant production in seawater, leading to bioremediation processes more fast and cost-effective.

. The results were validated experimentally and shown that this approach can be used successfully to optimize operating conditions and biodegradation and biosurfactant production medium in seawater, leading to faster and more cost-effective bioremediation processes.

Key Words: kerosene, sea water, *Candida lipolytica*, biodegradation, optimization, genetic algorithm.

CAPITULO I

1. INTRODUÇÃO

A aplicação e combinação sinérgica entre **N**anotecnologia, **B**iotecnologia, Tecnologia da **I**nformação e **C**omunicação e **C**iências **C**ognitivas originou o que é denominado no meio científico por Convergência Tecnológica, e conhecido, principalmente no ambiente americano, pelo acrônimo **NBIC**, propiciando novas dimensões na compreensão e entendimento das ciências e tecnologias existentes, e produzindo cada vez mais, novos conhecimentos, materiais, aplicações e tecnologias (SÁENZ; SOUZA-PAULA, 2008).

Nas indústrias petrolíferas e biotecnológicas, esta convergência já é uma realidade e tem contribuído - através de técnicas computacionais inspiradas na natureza - para otimização de diversos processos, inclusive de biorremediação de áreas contaminadas por petróleo e derivados.

O petróleo e seus derivados têm sido utilizados como principal fonte de propulsão ao desenvolvimento da sociedade contemporânea, sendo um elemento chave para as atividades humanas como fonte de energia e como matéria prima para produção de diversos compostos (RAIGER LUSTMAN; LOPES, 2009).

Embora extremamente útil à sociedade, estudos indicam ser o petróleo elemento altamente poluidor e nocivo ao meio ambiente, sendo o seu manuseio e beneficiamento considerados como atividades de risco ao meio ambiente, visto que, desde o processo de extração até a sua utilização final, existe a possibilidade de contaminação residual ou acidental do ambiente (RAIGER LUSTMAN; LOPES, 2009). Os recursos hídricos encontram-se, portanto, em constante exposição a riscos de contaminação por petróleo e derivados, o que é preocupante, visto ser a água um bem fundamental e necessário à vida (LEME; MARIN-MORALES, 2007).

A enorme complexidade das composições de petróleo encontrados, aliada à falta de valores de referência sobre sua toxicidade torna abordagens de limpeza e de estratégias de biorremediação de áreas contaminados uma tarefa onerosa (BACOSA *et*

al., 2010). Dependendo dos objetivos e dos recursos financeiros e tecnológicos disponíveis, os processos físicos e químicos de limpeza utilizados para descontaminação do óleo em áreas poluídas possuem uma aplicação limitada ou restrita (PERFUMO *et al.*, 2010a; THAVASI *et al.*, 2011).

Com aplicações importantes para as atividades humanas (combustível para aviação, iluminação e aquecimento, solvente etc.), pela similaridade de sua estrutura química com a do petróleo, o querosene possui características poluentes acentuadas, colocando em risco o meio ambiente e seres humanos (BR DISTRIBUIDORA, 2010).

O rigor das novas regulamentações e a maior conscientização ambiental vem gerando estudos em busca de procedimentos para sanar ou minimizar o problema da contaminação por petróleo e derivados. Entretanto, a crescente demanda por petróleo e seus derivados direciona a maioria das soluções de recuperação de ambientes contaminados por derrames ao uso de métodos físicos, como lanças, escumadeiras e adsorventes, objetivando recuperar e devolver à cadeia produtiva parte do produto derramado, finalizando com a aplicação de métodos químicos e biológicos que possibilitem a degradação dos contaminantes persistentes no meio. (PERFUMO *et al.*, 2010b).

O uso de biossurfactantes, devido à maior biodegradabilidade, baixa toxicidade e compatibilidade ambiental, são preferíveis aos surfactantes sintéticos. No entanto, ainda existe muito a estudar sobre biossurfactantes produzidos por microrganismos marinhos ou ativos em água do mar (MANEERAT, 2005).

Processos de biodegradação e biorremediação dependem de vários fatores como: tipo, composição e concentração do poluente; temperatura; pressão; características físicas do ambiente ou meio; tamanho da população de microrganismos presentes; disponibilidade de oxigênio e nutrientes etc. Em muitos casos, a adição de insumos se faz necessário para criar as condições que possibilitam o aumento da população de microrganismo capaz de produzir a biodegradação (SONG *et al.*, 1990; AELION; BRADLEY, 1991; RAZA *et al.*, 2007ab; SHABIR *et al.*, 2008).

Devido aos vários fatores envolvidos nos processos de biodegradação, são importantes as investigações em busca das condições que propiciem melhores resultados no processo. Técnicas estatísticas univariadas ("um-fator-em-um-tempo")

aplicadas em otimização, requerem muito trabalho e muito tempo, não garantindo necessariamente a determinação das condições ideais, e não conseguem detectar interações sinérgicas entre dois ou mais fatores (McCARTY *et al.*, 1998).

Técnicas de otimização multivariada são aplicadas a situações, nas quais se desejem maximizar ou minimizar uma função numérica de uma ou mais variáveis, num contexto em que podem existir restrições. Técnicas clássicas de otimização, baseadas em equações diferenciais e cálculo variacional, são confiáveis e possuem aplicações nos mais diferentes campos de engenharia e de outras ciências. Porém, estas técnicas podem apresentar algumas dificuldades numéricas e problemas de robustez relacionados com fatores como a falta de continuidade das funções a serem otimizadas ou de suas restrições; funções não convexas; multimodalidade; existência de ruídos nas funções etc. O avanço tecnológico e dos recursos computacionais propiciaram o ressurgimento de otimização utilizando métodos heurísticos com busca randômica controlada por critérios probabilísticos, que necessitam de um número elevado de avaliações da sua função objetivo (SCHWEFEL; TAYLOR, 1994; SARAMAGO, 2013; PRADO; SARAMAGO, 2005).

A maioria dos problemas de otimização do mundo real envolve múltiplos objetivos, e a não obrigatoriedade de uma única melhor solução (mínimo ou máximo global) em relação a todos os objetivos. Pesquisas anteriores de otimização multiobjetivo com algoritmos evolucionários têm demonstrado serem capazes de encontrar tais soluções múltiplas e diversas que permitem ao usuário escolher entre muitos indivíduos (soluções). Mas a obtenção de uma solução particular que atenda às necessidades do usuário dentre estes indivíduos em um problema multiobjetivo é uma questão complexa, especialmente quando os objetivos são conflitantes (WANG; TAI, 2010). Muitos métodos de otimização global têm sido propostos, como Algoritmos Genéticos (AGs) (HOLLAND, 1975; MICHEL, 1996) e de Inteligência Coletiva (IC) (DORIGO *et al.*, 1996) que diferem de outros métodos de busca tradicionais na medida em que utilizam uma população de possíveis soluções e regras probabilísticas, ao invés de uma solução e regras de transição determinísticas (BATACHARIA *et al.*, 2009). Atividades ligadas à indústria de petróleo geram problemas matemáticos complexos, multimodais e com espaço de busca de soluções praticamente infinito, para

os quais os AGs apresentam-se como ferramenta alternativa para encontrar soluções eficientes (LINDEN, 2008b).

O início das atividades produtivas da Refinaria de Petróleo Abreu e Lima, no Complexo Industrial Portuário de Suape, entre os municípios de Cabo de Santo Agostinho e Ipojuca, no estado de Pernambuco, estava previsto para ocorrer em 2011 (GURGEL *et al.*, 2009). Em um novo cronograma, a Petrobras informou que os primeiros produtos só devem sair da refinaria no segundo semestre de 2014 (PETROBRAS, 2012). Esta refinaria tem para o Brasil objetivos estratégicos dentre os quais: a garantia da autossuficiência de produtos derivados do petróleo dentro do mercado nacional; a redução da importação de óleo diesel e petróleo leve. Regionalmente, existem interesses sociais e econômicos com a geração de empregos e desenvolvimento da região (GURGEL *et al.*, 2009).

Embora sejam muitos os benefícios, empreendimentos deste vulto, relacionados à indústria de petróleo em suas atividades de refino e transporte, inevitavelmente concorrem ao aumento de riscos ao meio ambiente e à população da região, através da exposição à poluição crônica e intermitente, geralmente com efeitos em longo prazo, convivem com a expectativa e ao risco de um eminente derrame acidental de agentes poluidores que podem ser altamente comprometedores as condições da vida e as diversas atividades econômicas na região.

Para evitar ou reduzir riscos de contaminações ao meio ambiente, importa que a refinaria trabalhe sob condições de segurança adequadas, bem como o estado e a comunidade técnico-científica encontrem-se preparados e comprometidos a responder a uma eventual necessidade de implementar processos de remediação. Diante destas necessidades, universidades, institutos e empresas da região se mobilizam na realização de pesquisas que possibilitem direcionar ações de combates aos contaminantes de forma segura e eficaz sem maiores comprometimentos ao meio ambiente.

Neste contexto, este trabalho apresenta diferentes abordagens híbridas capazes de identificar condições ambientais (pH e nutrientes) para otimização individual ou simultânea dos processos de biodegradação de querosene e de produção de biossurfactantes em água do mar por *Candida lipolytica* UCP 0988.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Otimizar o processo de biodegradação de querosene e/ou o de produção de biossurfactante em água do mar por *Candida lipolytica* UCP 0988 usando abordagens híbridas uni e multirresposta baseadas em metodologia de superfície de resposta (MSR), métodos gradientes (GD) funções de desejabilidade e algoritmos genéticos (AG).

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar os processos de biodegradação de querosene e de produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* UCP 0988, em água do mar suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo.
- Desenvolver modelos de segunda ordem para concentração de biomassa e para a tensão superficial, a partir de dados de planejamento composto central tendo como variáveis independentes o pH e as concentrações de sulfato de amônio e fosfato de potássio.
- Identificar condições ambientais (pH e concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio) ótimas ou que representem o melhor compromisso entre maximização da concentração de biomassa e a minimização da tensão superficial usando abordagens híbridas baseadas em MSR, GD, FD e AG.
- Validar experimentalmente as condições previstas pelas diversas abordagens.
- Comparar os resultados obtidos pelas diversas abordagens.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Petróleo e derivados

O petróleo é uma mistura complexa formada por 200 a 300 compostos, inflamável, em geral menos densa que a água, com odor característico e cor variando, conforme as condições e histórico geológico do depósito fonte, entre o negro e o castanho escuro. Dependendo das condições de sua formação, sua composição é variável, incluindo compostos onde se destacam hidrocarbonetos (50 a 98%), nitrogênio (0 a 0,5%), enxofre (0 a 6%), oxigênio (0 a 3,5%) e alguns metais em concentrações traços (especialmente níquel e vanádio). Os hidrocarbonetos são formados por átomos de carbono e hidrogênio, sendo classificados segundo sua composição em alifáticos (alcanos ou parafinas, alcenos ou olefinas, alcadienos e alcadinós); cíclicos (cicloalcanos ou naftenos, cicloalcenos e cicloalcinos) e aromáticos; cada qual com suas especificidades relacionadas às características físicas, químicas e seus níveis de toxicidade, biodegradabilidade, entre outras, de importância ao ambiente e saúde dos seres humanos. O petróleo é formado principalmente por hidrocarbonetos parafínicos (15 a 60%), naftênicos (30 a 75%) e aromáticos (6 a 30%) (KOLESNIKOVAS, 2006; LEME; MARIM-MORALES, 2007; SANTOS, 2009).

O petróleo é um elemento chave para as atividades humanas, utilizado como fontes de energia ou matéria prima para produção de diversos compostos (RAIGER LUSTMAN; LOPES, 2009). Independente de sua composição, o petróleo apresenta diversos efeitos deletérios aos organismos, causando, mesmo em concentrações muito baixas, problemas relacionados à toxicidade, como a redução ou inibição da capacidade reprodutiva, até efeitos genotóxicos e mutagênicos. (LEME; MARIM-MORALES, 2007).

O petróleo por si só tem pouquíssimas aplicações práticas, servindo quase que exclusivamente como óleo combustível. Para que ele tenha seu potencial energético plenamente aproveitado, bem como sua utilização como fonte de matérias primas, é importante que seja realizado seu fracionamento em cortes, com padrões pré-estabelecidos para determinados objetivos, que são denominadas de frações (ABADIE, 2003). O objetivo da destilação é o desmembramento nas frações básicas do

refino, a saber: gás combustível, gás liquefeito, nafta, querosene, gasóleo atmosférico, gasóleo de vácuo e resíduo de vácuo. Seus rendimentos são variáveis, em função do óleo processado (MOREIRA, 2008).

3.2. Querosene

3.2.1. Destilação, Composição e Aplicações

O querosene é uma mistura de hidrocarbonetos, resultante da destilação fracionada do petróleo, em temperaturas de ebulição entre 150 e 300°C. A composição química depende de sua fonte, mas ele usualmente consiste de aproximadamente dez diferentes hidrocarbonetos, cada um contendo de 10 a 16 átomos de carbono por molécula; os constituintes incluem n-dodecanos, alquil-benzenos e naftalenos e seus derivados (SPEIGHT, 2011).

Encontrado em algumas variações de sua composição química ou características físicas, o querosene caracteriza-se por possuir diversas aplicações. Inicialmente destinado à iluminação residencial, foi o derivado de petróleo mais importante até 1911, quando ocorreu a popularização dos automóveis com motores a gasolina. Somente em 1939, com o desenvolvimento dos aviões de propulsão a jato, o querosene voltou a ser amplamente utilizado, desta feita como combustível. No entanto, pode ser empregado ainda como solvente, produto de limpeza, óleo de aquecimento e óleo em *spray* para combater insetos em plantas cítricas, entre outros. Durante a Segunda Guerra, devido à maior disponibilidade do querosene em relação à gasolina, o querosene foi escolhido como o combustível para os aviões com motores a jato. Consequentemente, após a guerra, os aviões militares e comerciais, passaram a usá-lo como combustível (IRWIN *et al.*, 1997, FRANCISCO, 2011).

3.2.2. Caracterização do querosene iluminante

A Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico (FISPQ) - (BR DISTRIBUIDORA, 2010), apresenta as seguintes informações gerais sobre o querosene iluminante:

- a. Denominação / sigla: Querosene Iluminante/ QI,
- b. Código do Produto: 01.000.102 (Petrobrás Distribuidora S.A);
- c. Composição Química: Mínimo de 70% em Hidrocarbonetos parafínicos, máximo de 20% em Hidrocarbonetos aromáticos, máximo de 5% em Hidrocarbonetos oleofínicos e máximo de 0,10 (% vol.) de Benzeno [CAS 71-43-2].
- d. Riscos: Líquido combustível, inflamável e nocivo ao ser humano e ao meio ambiente. Exige cuidados no manuseio e armazenagem.
- e. Toxicidade: Se inalado ou ingerido atua como depressor no sistema nervoso central (SNC).
- f. Limites de exposição humana: 14 ppm ou 100 mg/m³ para 10 horas de exposição.

As principais propriedades físico-químicas do QI, fornecidas pela FISQP da BR são apresentadas na Tabela 1. Segundo a FISPQ da BR, em relação à capacidade de combustão, o QI é estável em condições ambientais normais, mas possui características comuns aos derivados de Petróleo apresentando-se como elemento poluidor do meio ambiente (BR DISTRIBUIDORA, 2010).

Atividades de transporte, armazenamento ou manuseio do querosene estão sujeitos a Resolução 420 de 12 de fevereiro de 2004 do Regulamento do Transporte Terrestre de Produtos Perigosos do Ministério do Transporte, objetivando-se minimizar riscos de acidentes.

Tabela1. Propriedades Físico-Químicas do Querosene Iluminante

Aspecto	Estado Físico	Líquido límpido (isento de água e material em suspensão).
	Cor	Claro
	Odor	Característico e desagradável
	pH	Não disponível
Temperaturas específicas	Ponto de Fusão	Não disponível
	Ponto de Ebulição	Não disponível
	Faixa de destilação	150 – 300 °C a 101,325 kPa (760mmHg)
	Ponto de Fulgor (TCC)	40 °C (vaso fechado)
Taxa de Evaporação		Não disponível
Inflamabilidade		Não disponível
Temperatura de auto-ignição		238 °C
Limites de explosividade no ar	Superior (LSE)	0,5%
	Inferior (LIE)	0,7%
Pressão de vapor		1,4 Pa (10,5 mmHg a 38 °C)
Densidade de vapor (ar = 1)		4,5
Densidade		< 1
Solubilidade	Na água	Levemente solúvel (<5)
	Em solventes orgânicos	Solúvel
Limite de odor		1ppm
Viscosidade		2,7 cSt a 20 °C, método: MB 293
Coeficiente de partição		Não disponível

Fonte: Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico (FISPQ) para o Querosene Iluminante (BR DISTRIBUIDORA, 2010)

3.3. Água do Mar

Á água é um dos recursos mais valiosos e importantes à sobrevivência do ser humano e muitos outros seres, devendo estar presente na natureza em condições adequadas a vida (DREW, 1998).

Muito embora a superfície de nosso planeta seja constituída em grande parte por água, constata-se que apenas uma pequena porção apresenta-se naturalmente adequada ao consumo humano, haja vista que 97,5% da água do planeta estão concentradas nos oceanos com altas proporções de sais e 1,8% nas geleiras. A água doce é fundamental à vida nos ecossistemas terrestres, essencial à agricultura, responsável pelo povoamento de vastas regiões e importante no desenvolvimento industrial (BONACELLA; MAGOSS, 1990).

A água do mar, em relação a sua composição química, torna os mares e oceanos um sistema único se comparado com outros sistemas aquosos naturais, sendo a alta concentração de solutos e a baixa flutuação geográfica da concentração dos mares e oceanos os fatores que o diferencia dos demais sistemas. Embora os mares e oceanos estejam sujeitos aos movimentos oriundos dos ciclos hidrológicos que promovem precipitações e dissoluções de diferentes solutos em diferentes tempos, a água do mar apresenta características de concentração consideravelmente constantes tanto em sua profundidade quanto em sua extensão (LIBES, 1992; SOUZA, 2009).

A água do mar é constituída por quase todos os elementos, do hidrogênio ao urânio, e é composta por 96,7% de água e 3,3% de sais dissolvidos (Tabela 2), sendo que 7 elementos (Cl 54%, Na 31%, SO₄ 8%, Mg 4%, Ca 1%, P 1%, Outros 1%), respondem por cerca de 93,5% destes sais dissolvidos, todos em sua forma iônica. A superfície do mar apresenta a água com densidade entre 1020 e 1029 Kg m⁻³, dependendo da temperatura e da salinidade. Em oceano profundo, sob alta pressão, a densidade pode chegar a 1050 Kg m⁻³ ou mais. O pH da água do mar se mantém geralmente entre 7,5 e 8,4 (MATSUURA, 2001; SOUZA, 2009).

3.4. Poluição do Ambiente Marinho por Petróleo e Derivados

A quantidade de petróleo e derivados lançada anualmente nos mares e oceanos é de difícil estimativa, tendo em vista a omissão de informações reais dos poluidores ou pela incapacidade dos sistemas fiscalizadores governamentais (ALEIXO *et al.*, 2007).

São diversas as fontes de poluição do ambiente marinho. Destacam-se entre elas, as seguintes: acidentes com vazamento de grandes quantidades de petróleo de navios e plataformas marítimas, vazamentos espontâneos de gás e óleo do fundo do mar, água de lastro de navio e descargas urbanas residenciais e industriais, sendo que estas últimas representam um percentual aproximado de 37% de todo petróleo lançado ao mar (ALEIXO *et al.*, 2007; CARDOSO, 2007).

Estima-se que as contaminações crônicas, relacionadas a derramamentos em proporções pequenas – que ocorrem de forma constante ou intermitente e sem a mesma repercussão nos meios de comunicação que os grandes acidentes - sejam a principal forma de contaminação do ambiente marinho, especialmente em áreas urbanas, devido à forma sutil como se estabelecem (ZIOILLI, 2002; SILVA, 2004). A Resolução CONAMA nº. 20 de 1986, que classifica os diferentes corpos de água e estabelece limites de lançamentos, institui um teor máximo de óleo e graxa de 20 ppm em águas a serem lançadas no ambiente (SILVA, 2004).

Os acidentes de grandes proporções com petróleo e derivados em ambiente marinho despertam grande atenção do público, em geral, devido às imagens divulgadas apresentarem alto grau de dramaticidade (CARAPETO, 2010; CARDOSO, 2007; SILVA, 2004).

Contaminações agudas decorrentes de grandes derramamentos originados por acidentes destacam-se por causar sérios danos ao meio ambiente e ao sistema costeiro. Exemplos deste tipo de contaminação são os acidentes com os petroleiros *Amoco-Cadiz* (Costa da França, 16 de março de 1978), *Exxon Valdez* (Alasca, 24 de março de 1989) e *Torrey Canyon* (Costa da Inglaterra, 1967) (ZIOILLI, 2002; SILVA, 2004). Acrescente-se a estes e outros não citados, o acidente ocorrido no dia 22 de abril de 2010 com a plataforma *Deep Water Horizon* operada pela BP no golfo do

México, já considerado o maior desastre ambiental por vazamento de Petróleo até então registrado; e em solo brasileiro o acidente ocorrido em novembro de 2011 com a plataforma de petróleo administrada pela *Chevron* na Bacia de Campos, no litoral norte do Estado do Rio de Janeiro.

Com características químicas similares ao petróleo e outros derivados, estudos apresentam o querosene como elemento poluidor em ambiente marinho, inserido, em grande parte, em processos de transporte e/ou manuseio do próprio querosene em atividades no mar ou nas regiões costeiras, dentre as quais se destacam: despejos das refinarias costeiras; acidentes envolvendo navios petroleiros e outros tipos de navios, operação dos petroleiros nos terminais; águas de lavagem de tanques dos petroleiros; águas de lastro. As operações em terra e descartes de combustível por aeronaves também atingem os ecossistemas aquáticos (CARAPETO, 2010; CARDOSO, 2007; ALEIXO *et al.*, 2007; SILVA, 2004; ZIOLLI, 2002).

De acordo com o Sistema de Notificação de Resposta a Emergências da Guarda Costeira dos EUA, querosene é um dos produtos petrolíferos mais comumente derramados. Ele contém parafinas (alcanos), cicloparafinas (cicloalcanos), aromáticos e olefinas de aproximadamente nove a vinte átomos de carbono (GOUDA *et al.*, 2007; IRWIN *et al.*, 1997).

Poluentes orgânicos derivados de petróleo são geralmente de difícil biodegradação. Justamente por essa característica, seu principal impacto na água não é o consumo de oxigênio e sim a sua toxicidade à biota. Os hidrocarbonetos de petróleo e derivados espalham-se sobre a superfície da água, formam um filme superficial que impede a difusão do oxigênio e reduzem a capacidade de reoxigenação da água (STRUJAK; VIDAL, 2007).

A toxidade dos hidrocarbonetos está diretamente relacionada à sua resistência a degradação e com a sua tendência e facilidade de incorporação nos diversos compartimentos do ecossistema. Os compostos de cadeia linear ou ramificada, são os que se degradam mais depressa, ao contrário dos compostos cíclicos. Compostos de elevado peso molecular tendem a formar resíduos que, por apresentarem uma pequena superfície em relação ao volume, sofrem uma degradação extremamente lenta (CARAPETO, 2010).

Após um derrame de petróleo na água, os primeiros organismos a sofrerem os efeitos tóxicos são aqueles que compõem o fitoplâncton e o zooplâncton. (CARAPETO, 2010; CARDOSO, 2007; SILVA, 2004).

Os efeitos biológicos dos hidrocarbonetos do petróleo sobre os organismos marinhos dependem de sua persistência e biodisponibilidade, da capacidade dos organismos de acumular e metabolizar diversos hidrocarbonetos, do destino dos produtos metabolizados, e da interferência dos hidrocarbonetos sobre os processos metabólicos normais que podem alterar as chances de sobrevivência e reprodução de um organismo (SILVA, 2004).

Ecossistemas inteiros podem ser afetados em casos de contaminação por petróleo ou derivados. A extensão e os efeitos sobre os organismos dependem de vários fatores como a composição do elemento poluidor e suas modificações quando do desgaste, concentração de poluentes, geografia, condições ambientais, tipo de ambiente contaminado e a energia disposta no ambiente. Os organismos podem sofrer intoxicações simples, morte direta ou prematura, ou ainda sofrer anomalias em organismos e suas gerações. Como consequência de poluições, populações inteiras podem ser eliminadas de uma região, ou ocorrência de grande fluxo migratório para outras áreas. As recuperações das áreas, além de ações de descontaminação, necessitam em muitos casos da adoção de processos de recolonizações através da transferência de sementes de plantas e da fauna, e de processo migratório das regiões não afetadas para a região recuperada. Prever ou avaliar extensão dos efeitos de um agente contaminante sobre o ecossistema não é fácil, devido às muitas variáveis e o tempo que as mesmas se perpetuam (CARAPETO, 2010).

A avaliação do impacto e a gravidade da contaminação por petróleo e derivados em ambiente marinho devem levar em consideração: (i) a extensão da área atingida, onde derrames em mar aberto podem ser considerados mais graves que os em áreas confinadas, quando considerada a extensão da área de combate e os possíveis fatores a considerar; (ii) as características de preservação da área atingida, que considera menos graves derrames em áreas já contaminadas (áreas portuárias, urbanas etc.) comparados aos derrames ocorridos em áreas preservadas, onde o

ecossistema é geralmente mais sensível e os danos ecológicos podem se tornar mais críticos (ZIOILLI, 2002).

3.5. Processos de Remediação

Lançamentos de petróleo ou derivados no ecossistema aquático, sejam acidentais ou intencionais, geram uma série de processos relacionados aos poluentes denominados de intemperismo. O intemperismo pode ocorrer através dos processos de espalhamento, evaporação, dissolução, dispersão, oxidação fotoquímica, emulsificação de água no petróleo, degradação microbiana, adsorção a material particulado em suspensão, ingestão por organismos e sedimentação, e dependem de fatores como temperatura, pressão, velocidade dos ventos e correntes, salinidade, entre outros (CARAPETO, 2010; CARDOSO, 2007; SILVA, 2004). Durante o processo da degradação do óleo há formação de novos compostos, por vezes com propriedades tóxicas aumentadas e consequências ambientais diversas (CARAPETO, 2010).

Operações de limpeza e descontaminação devem ter em pauta uma gestão que observe a destinação de resíduos e materiais contaminados, considerando seu acondicionamento, segregação e identificação de acordo com suas características. O gerenciamento dos resíduos inclui a adoção de técnicas que minimizem a sua produção, procedimentos adequados para armazenamento temporário, considerações sobre o transporte, tratamento e destinação (CARDOSO, 2007; COUTINHO; GOMES, 2007).

As ações de combate aos contaminantes incluem a contenção e remoção do produto do mar e a limpeza dos ambientes costeiros atingidos por meio de técnicas apropriadas. Para que as ações de combate sejam adequadamente escolhidas, objetivando minimizar os danos provocados pelos derramamentos de óleo no meio ambiente, são necessários procedimentos iniciais no sentido de se conhecer o cenário envolvido no acidente, quando então se pode definir as estratégias de combate e dimensionar os recursos necessários para uma resposta efetiva. Devido aos vários

fatores as condições podem se modificar rapidamente. Por isto, as condições devem ser reavaliadas periodicamente, possibilitando a orientação das ações (CARDOSO, 2007; COUTINHO; GOMES, 2007).

As principais técnicas de combate a incidentes de derramamento de óleo incluem: métodos físicos como o uso de barreiras de contenção, materiais absorventes, remoção através de algum processo de arrasto (rodos, pás, latas etc.) e ainda a utilização de jatos de água; métodos químicos como utilização de dispersantes de origem orgânica, cuja aplicação no Brasil encontra-se regulamentada na Resolução CONAMA nº 269, de 2000; e métodos biológicos como a utilização de surfactantes de origem microbiana (CARDOSO, 2007).

Processos físicos e químicos de limpeza utilizados para a descontaminação do óleo de áreas poluídas possuem uma eficiência limitada em sua aplicação (PERFUMO *et al.*, 2010a). Métodos de coleta física utilizando-se lanças, escumadeiras, e adsorventes geralmente recuperam de 10-15% do óleo derramado e o uso de surfactantes químicos como agente de remediação não é favorável devido aos seus efeitos tóxicos sobre a biota presente na área (PERFUMO *et al.*, 2010b).

3.6. Biorremediação

A biorremediação é um conjunto de técnicas biotecnológicas em que se utilizam microrganismos ou produtos e processos microbianos para a redução de impactos causados ao meio ambiente por contaminantes (ATLAS,1995). É uma alternativa ecologicamente adequada e eficaz para o tratamento de ambientes aquáticos ou terrestres contaminados por moléculas orgânicas recalcitrantes e metais (GAYLARDE *et al.*, 2005; ABOUSEOUD *et al.*, 2010).

Estratégias de biorremediação incluem a utilização de microrganismos autóctones, ou seja, do próprio local, sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação (biorremediação intrínseca ou natural); a adição de agentes estimulantes como nutrientes, oxigênio e biosurfactantes (processo de

bioestimulação); e a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (bioaumento) (BENTO *et al.*, 2003).

A biorremediação *in situ* é realizada no próprio local, sem que haja remoção de material contaminado. Isto evita custos e distúrbios ambientais associados com o movimento de solos e águas de um local contaminado para outros locais destinados ao tratamento. Os produtos finais de uma biorremediação efetiva são água e gás carbônico (processo denominado mineralização), compostos estes, que não apresentam toxicidade e que podem ser incorporados ao ambiente sem prejuízo aos organismos vivos (MARIANO, 2006).

Quando há a necessidade de retirada de solo ou efluente do local contaminado para que os mesmos sejam tratados em outro local, o processo é chamado de biorremediação *ex situ*. A remoção pode ser necessária quando há possibilidade de contaminação de pessoas e do ambiente próximo do solo a ser biorremediado, ou quando a presença de altas concentrações de contaminantes demandam a utilização de técnicas como compostagem, biorreatores, entre outras (JACQUES *et al.*, 2007).

3.7. Biodegradação

Biodegradação por populações nativas de microrganismos representa um dos mecanismos primários pelos quais os compostos poluentes são eliminados do meio ambiente. Alguns compostos do petróleo são facilmente evaporados ou biodegradados, enquanto outros persistem recalcitrantes na natureza (LEE e LEVY, 1988).

Petróleo bruto, bem como outros hidrocarbonetos comerciais, pode apresentar diferentes graus de degradação, em solos e águas, dependendo do tipo e da concentração total de hidrocarbonetos e da disponibilidade de oxigênio e nutrientes. Os hidrocarbonetos presentes no querosene, por exemplo, geralmente não são inibidores da atividade microbiana (SONG *et al.*, 1990; AELION; BRADLEY, 1991) e

são significativamente biodegradáveis em condições aeróbias, desde que quantidades suficientes de nutrientes essenciais estejam presentes (RAZA *et al.*, 2007a; SHABIR *et al.*, 2008).

A biodegradação vem sendo empregada com sucesso na limpeza de água do mar e solos contaminados por petróleo bruto. Pesquisadores têm sugerido a adição de degradadores de hidrocarbonetos específicos para aumentar a taxa de biodegradação no processo (ATLAS; BARTHA, 1972).

3.8. Biossurfactantes

Surfactantes são compostos anfífilos contendo uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica e, portanto, capazes de exibir uma variedade de atividades superficiais que permitem solubilização de substratos hidrofóbicos. Objetos de pesquisas como possíveis substitutos para os surfactantes sintéticos, os surfactantes de origem microbiana ou biossurfactantes tem sido usado com sucesso em diversas aplicações industriais e ambientais, relacionadas com a emulsificação, formação de espuma, detergência, umectação, dispersão e solubilização de compostos hidrofóbicos (DESAI E BANAT, 1997, SATPUTE *et al.*, 2010).

O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes. Outras aplicações incluem biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a melhor recuperação de petróleo. Porém, suas aplicações se distribuem entre os mais diversos setores industriais (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

A biodegradação de petróleo e derivados é bastante limitada pela baixa biodisponibilidade e natureza pouco solúvel dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). Mediada por surfactante, biodegradação é uma alternativa promissora. A presença de surfactantes pode aumentar a solubilidade de HAPs e, portanto,

potencialmente aumentar sua biodisponibilidade (GAYLARDE *et al.*, 2005; ABOUSEOUD *et al.*, 2010; KACZOREK *et al.*, 2010).

Os surfactantes sintéticos têm sido utilizados na indústria do petróleo, ajudando na limpeza de derramamentos e na recuperação de petróleo em reservatórios. Entretanto, estes produtos podem ser tóxicos ao ambiente e não são biodegradáveis. Por outro lado, os biosurfactantes apresentam vantagens como baixa toxicidade, natureza biodegradável e eficácia em espectro amplo de variações de temperatura, pH e salinidade, além da facilidade de síntese (TABATABAEE *et al.*, 2005; ABOUSEOUD *et al.*, 2010).

3.9. Microrganismos Marinhos Degradadores de Hidrocarbonetos

Biorremediação de petróleo é realizada por microrganismos tais como bactérias, fungos, leveduras e microalgas capazes de utilizar hidrocarbonetos como única fonte de energia (REISFELDT *et al.*, 1972; SOKOLOV *et al.*, 2008).

A presença de hidrocarbonetos em toda a biosfera pode explicar a capacidade de muitas espécies microbianas em utilizar estes compostos como substrato de crescimento, degradando poluentes do petróleo e utilizando-os como fonte de carbono e energia (WETLER-TONINI *et al.*, 2010)

A habilidade em degradar hidrocarbonetos não é restrita apenas a gêneros específicos de microrganismos, pois, vários grupos de bactérias, fungos, algas e algumas cianobactérias têm mostrado possuir essa capacidade (MARIANO, 2006). Em ambientes naturais ou em laboratório, a biodegradação do petróleo não pode ser realizada por uma única espécie microbiana, uma vez que este poluente é constituído por vários tipos de hidrocarbonetos e nenhum microrganismo é capaz de degradar sozinho todos os compostos ali presentes. A complexidade dos processos metabólicos necessários a essa degradação leva à formação de consórcios, com microrganismos de diferentes gêneros e espécies, cada um especializado em degradar uma ou várias frações do óleo (CRAPEZ *et al.*, 2002; TIBURTIUS *et al.*, 2004; JACQUES *et al.*, 2007).

Os oceanos representam uma vasta e exaustiva fonte de produtos naturais, abrigando os mais variados grupos da flora e da fauna. Os microrganismos marinhos desenvolveram capacidades metabólicas e fisiológicas únicas para prosperar em ambientes extremos e produzir metabólitos novos que não estão frequentemente presentes em microrganismos de origem terrestre. Este ambiente oferece uma oportunidade magnífica para descoberta de novos compostos (antibióticos, enzimas, vitaminas, medicamentos, biossurfactante, bioemulsificantes etc.) que podem apresentar alguma importância à sociedade (SATPUTE, *et al.*, 2010).

Vários tipos de microrganismos marinhos podem degradar os hidrocarbonetos constituintes do petróleo. Aproximadamente 200 espécies identificadas podem metabolizar desde metano (C₁) até compostos mais pesados (C₄₀). Porém, nenhuma das espécies tem apresentado a capacidade de degradar completamente um dado óleo. Por serem seletivos, é necessário empregar diferentes espécies em uma associação de culturas para apresentar uma mineralização significativa (LEE e LEVY, 1988).

A atividade microbiana em ambientes marinhos é considerada de forma geral limitada pelos baixos níveis de nutrientes orgânicos como nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), que são essenciais ao crescimento da colônia de microrganismos em ambientes contaminados por hidrocarbonetos. Assim, a biodegradação de óleo em ambiente marinho é tipicamente limitada pelo fornecimento destes nutrientes. A adição de nutrientes orgânicos com N, P, K para minimizar parcialmente esta limitação tem mostrado ser uma forma econômica e ambientalmente aceitável para estimular a biodegradação (PRINCE; BRAG, 1997; VIAS; DAVE, 2010).

Leveduras das espécies *Candida lipolytica*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Geotrichum sp*, e *Trichosporon mucoides* isoladas de água contaminada foram identificadas como tendo potencial para degradar compostos de petróleo (BOGUSLAWSKA-WAS; DABROWSKI, 2001).

Microrganismos degradadores de hidrocarbonetos podem produzir biossurfactantes e emulsificar misturas de hidrocarbonetos em água, propriedades potencialmente importantes em aplicações para controle de poluição por derramamento de óleo em solos e águas (SATPUTE *et al.*, 2010).

Foram relatados que comunidades microbianas como *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Enterobacter*, e leveduras tem sido capazes de produzir biossurfactantes/bioemulsificantes (SCHULZ *et al.*, 1991; PASSERI *et al.*, 1992; BANAT, 1993; ABRAHAM *et al.*, 1998; MANEERAT *et al.*, 2006; PERFUMO *et al.*, 2006; DAS *et al.*, 2008a,b).

Poucos artigos de revisão estão disponíveis sobre produção de biossurfactantes/bioemulsificantes e exopolissacarídeos de microrganismos marinhos (SAPUTE *et al.*, 2010; NERURKAR *et al.*, 2009; CHI *et al.*, 2005; MANEERAT, 2005; WEINER, 1997; WEINER *et al.*, 1985; BERTRAND *et al.*, 1993).

Trabalhos também têm sido publicados na literatura sobre biossurfactantes ativos, produzidos em água do mar por *Candida lipolytica* UCP 0988 usando como substrato óleo diesel (SOUZA, 2009; SOUZA *et al.*, 2012) e/ou óleos vegetais (HARROP *et al.*, 2003; ALBUQUERQUE *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2012).

3.10. *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica é um microrganismo estritamente aeróbio, eucariótico, do reino Fungi, pertencente à classe dos Ascomycetos, subclasse Hemiascomycetos. Esta levedura, que originalmente era chamada *Candida lipolytica*, é uma espécie das chamadas leveduras não-convencionais e seu estudo tem atraído grande interesse, pois apresenta uma grande aplicação biotecnológica por sua capacidade de metabolizar lipídeos e hidrocarbonetos e de excretar diversos metabólitos em grande quantidade – ácidos orgânicos e proteínas extracelulares – sendo muito usada para expressão e secreção de proteínas específicas (BARTH; GAILLARDIN, 1997).

Linhagens de *Y. lipolytica* têm sido isoladas de ambientes marinhos e hipersalinos implicando que este fungo pode desempenhar um papel significativo em tais ambientes (BUTINAR *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2007; ZINJARDE *et al.*, 2008).

Análise de 20 amostras de sedimentos marinhos e de água em torno de Mumbai resultou no isolamento de 17 linhagens de bactérias e de 6 linhagens de

leveduras. Todos os isolados foram capazes de degradar mais do que 10% do petróleo bruto fornecido. As linhagens de levedura foram degradadores importantes da fração alifática do petróleo bruto. Todas as leveduras isoladas pertenciam ao gênero *Candida*. Usando testes bioquímicos as leveduras identificadas foram *Candida parapsilosis*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *Y. lipolytica*, *C. tropicalise* *C. intermedia*. O isolado de *Y. lipolytica* foi o melhor degradador, utilizando 78% da fração alifática petróleo bruto de Bombay High, dentro de 5 dias com agitação em 200 rpm. Nenhum destes isolados degradou as frações aromáticas ou asfaltênicas. Para a degradação ótima, todos os isolados necessitaram de aeração, suplementação com nitrogênio e fosfato (ZINJARDE; PANT, 2002).

Entre seis linhagens de leveduras isoladas de área contaminada por petróleo no Golfo Pérsico, duas linhagens, identificadas como estirpes de *Y. lipolytica* PG-20 e PG-32, mostraram alta atividade de degradação hidrocarbonetos alifáticos, 68 e 58% respectivamente. Os resultados sugerem que as estirpes da *Y. lipolytica* PG-20 e PG-32 têm alta atividade de degradação em óleo bruto, devido à sua elevada atividade emulsionante e hidrofobicidade celular (HASSANSHAHIAN *et al.*, 2012).

Este organismo tem sido usado como sistema modelo para estudar os mecanismos envolvidos na degradação de substratos hidrofóbicos (SH). Entre as várias leveduras que são capazes de assimilar SH, *Y. lipolytica* apresenta as seguintes vantagens (THEVENIEAU *et al.*, 2010): (1) a sequência completa de seis cromossomos já foi determinada (DUJON *et al.*, 2004); (2) esta espécie é haplóide, o que não é o caso de muitas leveduras degradando SH, como *Candida tropicalis*; (3) muitas ferramentas genéticas são disponíveis para manipulação de genes em *Y. lipolytica* (BARTH; GAILLARDIN, 1996). Diversos outros trabalhos também ratificam a eficiência da levedura *Y. lipolytica* como degradadora de substratos hidrofóbicos, inclusive hidrocarbonetos (BANKAR *et al.*, 2009; COELHO *et al.*, 2010).

3.11. Otimização de Processos de Biodegradação

Devido à complexidade metabólica dos microrganismos e ao grande número de variáveis envolvidas, o desenvolvimento de modelos rigorosos para um dado sistema de reações biológicas sobre bases físicas e químicas é ainda um desafio crítico. Isto ocorre principalmente em decorrência da natureza não linear das interações das redes bioquímicas, e em alguns casos, do conhecimento incompleto sobre as cinéticas envolvidas em tais sistemas (FRANCO-LARA *et al.*, 2006). Em geral, não é necessário nem desejável construir modelos de bioprocessos descrevendo o sistema em todas as condições possíveis com alta precisão. A modelagem deve ser considerada como um passo para alcançar mais facilmente o objetivo final – a otimização do processo biotecnológico. O modelo tem que descrever aqueles aspectos que afetam significativamente o desempenho do processo (ROEVA, 2006).

Várias tecnologias e procedimentos de biorremediação estão sendo usados e um número de abordagens promissoras têm sido propostas. Algumas destas tecnologias aplicadas para biodegradação *in situ*, nas quais a poluição em subsuperfície é degradada, são baseadas na estimulação de crescimento de microrganismos endógenos na subsuperfície. O crescimento e a eficiência de biodegradação por microrganismos precisa ser otimizado através de simulação adicional de condições *in situ*. Pelo fornecimento de oxigênio (ou de qualquer aceptor de elétrons) e nutrientes, microrganismos podem acelerar a biodegradação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP) de água subterrânea ou coluna de água submersa. Adição de uma fonte de carbono como nutriente aumenta a biomassa de microrganismos do solo, mas pode inibir a biodegradação de contaminantes com crescimento diaúxico (LEE *et al.*, 2003). Assim é importante adicionar quantidades ótimas de nutrientes que podem acelerar a biodegradação *in situ* (ZAFAR *et al.*, 2010).

Condições ambientais podem ser alteradas ou controladas para otimizar o crescimento e as atividades metabólicas dos microrganismos. Algumas dessas condições são: presença de oxigênio e de nutrientes contendo compostos de nitrogênio e fósforo, e pH (ADAMASSU E KORUS, 1996).

A redução do tempo e do custo e o aumento da eficiência de biodegradação são objetivos fundamentais em processos de biorremediação ambiental. Nesta aplicação específica, o objetivo da otimização é determinar as condições de biorremediação mais adequadas, tais como pH, temperatura e concentrações de nutrientes que maximizam a eficiência de biodegradação (ZAFAR *et al.*, 2010).

Nas duas últimas décadas, Metodologia de Superfície de Resposta (MOHAJERI *et al.*, 2010; ZAHED *et al.*, 2010) e algoritmos genéticos (BHATTACHAYRA *et al.*, 2009; ZAFAR *et al.*, 2010) vem se destacando, acentuadamente, em relação a outras técnicas usadas para otimização de processos de biodegradação devido a eficácia e bons resultados obtidos.

3.12. Metodologia de Superfície de Resposta

A metodologia de superfície de resposta (MSR) consiste em uma coleção de técnicas estatísticas e matemáticas úteis para desenvolvimento, melhoria e otimização de processos, nos quais a variável dependente, resposta ou de interesse é influenciada por várias variáveis independentes e o objetivo é otimizar esta variável resposta. A MSR tem aplicações importantes em planejamentos, desenvolvimento e formulação de novos produtos, e também na melhoria de projetos e produtos existentes. Ela define os efeitos e interações das variáveis independentes no processo. Além da análise dos efeitos das variáveis independentes, esta metodologia experimental gera um modelo matemático, que descreve o bioprocessos (MYERS E MONTGOMERY, 1995).

Algumas etapas da aplicação da MSR como uma técnica de otimização são as seguintes: (1) a seleção de variáveis independentes com efeitos significativos sobre o sistema por meio de experimentos preliminares e à delimitação da região experimental, de acordo com o objetivo do estudo e da experiência do pesquisador; (2) a escolha do planejamento experimental e realização de ensaios de acordo com a matriz experimental selecionada; (3) o tratamento matemático-estatístico dos dados experimentais obtidos através do ajuste de uma função polinomial; (4) a avaliação da adequação do modelo; (5) a verificação da necessidade e da possibilidade de

realização de um deslocamento em direção à região ótima; e (6) a obtenção dos valores ideais para cada variável estudada (BEZERRA *et al.*, 2008). A validação do modelo com dados experimentais é outra etapa importante da MSR.

3.13. Algoritmos Genéticos (AGs)

3.13.1. Características Gerais

Algoritmos Genéticos (AGs) podem ser definidos como técnicas de busca baseadas numa metáfora do processo biológico de evolução natural, ou seja; são algoritmos de busca cujos processos são baseados em mecanismos de seleção natural e genético. Pertencem à classe dos métodos probabilísticos de busca e otimização, embora não sejam aleatórios; ou seja, usa-se o conceito de probabilidade, mas AGs não são simplesmente processos de buscas aleatórias. Os AGs através das técnicas que os caracterizam, dirigem a busca para regiões de espaço onde é “provável” que os pontos ótimos possam ocorrer (LINDEN, 2008a).

Em AGs, uma população de possíveis soluções para o problema em questão evolui de acordo com operadores probabilísticos concebidos a partir de metáforas biológicas, de modo que há uma tendência de que, na média, os indivíduos representem solução cada vez melhores à medida que o processo evolutivo continua (TANOMARU, 1995; LINDEN, 2008a).

AGs utilizam-se de técnicas heurísticas de otimização global, que representam uma oposição aos métodos gradientes (*Hill Climbing*) que perseguem a solução através da derivada de uma função com o propósito de encontrar o máximo de uma função, que faz com que o processo fique retido em máximos locais (LINDEN, 2008a).

Os AGs apresentam a vantagem de permitir a simplificação na formulação e solução de problemas de otimização. AGs simples normalmente trabalham com descrições de entrada formadas por cadeias de bits de tamanho fixo. Outros tipos de AGs podem trabalhar com cadeias de bits de tamanho variável, como por exemplo, AGs usados para Programação Genética. AGs possuem um paralelismo implícito decorrente da avaliação independente de cada uma dessas cadeias de bits, ou seja, pode-se avaliar a viabilidade de um conjunto de parâmetros para a solução do problema de otimização em questão. AGs são indicados para a solução de problemas de otimização complexos, NP-Completo, como o "caixeiro viajante", que envolvem um grande número de variáveis e, conseqüentemente, espaços de soluções de dimensões elevadas. Além disso, em muitos casos onde outras estratégias de otimização falham na busca de uma solução, os AGs convergem. Os AGs são numericamente robustos, ou seja, não são sensíveis a erros de arredondamento no que se refere aos seus resultados finais (MIRANDA, 2011).

Um algoritmo desenvolvido como solução específica para um determinado problema que incorpore características específicas relacionadas a este problema, em geral, proporciona melhores resultados na resolução do problema que um AG básico. AGs devem ser aplicados para problemas considerados sem soluções conhecidas ou com soluções de maior grau de complexidade. Uma das principais aplicações dos AGs estão nas otimizações de processos (LINDEN, 2008a).

AGs são considerados métodos robustos, utilizados basicamente para resolver problemas em pesquisas numéricas, otimização de funções e aprendizagem de máquina, dentre outras áreas (GROSKO *et al.*, 2006). AGs apresentam-se como uma técnica de busca extremamente eficiente no seu objetivo de varrer o espaço de soluções próximas a solução ótima, quase sem necessitar interferência humana (LINDEN, 2008a).

Existem quatro diferenças básicas entre os AGs e os métodos tradicionais de busca e otimização: (1) AGs empregam uma codificação do conjunto de parâmetros e não os próprios parâmetros; (2) AGs operam em uma população e não em um único ponto; (3) AGs utilizam informações do valor da função custo e não informações sobre

derivadas da função de otimização; (4) AGs utilizam regras de transição probabilísticas e não determinísticas (SIERAKOWSKI, 2006).

3.13.2. Terminologia

Devido à inspiração nos mecanismos de evolução natural, as terminologias e expressões adotadas nos AGs se assemelham aos do campo da biologia genética (Tabela 2).

Tabela2.Terminologia aplicada em Algoritmo Genético X Linguagem Natural

Linguagem Natural	Algoritmo Genético	Significado em termos Computacionais
Cromossomo	Indivíduo, string, cromossomo, árvore.	Representa uma possível solução do problema
Gene	Gene ou Característica	É a menor porção existente dentro de um cromossomo.
Alelo	Valor	Instância de um gene.
Lócus	Posição	A posição em que um determinado gene se encontra na estrutura
Genótipo	Estrutura	Estrutura da Informação contida no Cromossomo
Fenótipo	Conjunto de parâmetros	Representação ou caracterização das informações contidas no Genótipo
População	Conjunto de Indivíduos que representam uma geração	Grupo de Indivíduos com potencial a solução do problema
Geração	Geração	Determinado instante de tempo de uma população

Fonte: Adaptado de Sierakowski (2006) e Linden (2008a).

3.13.3. Representação da população

Definir como serão representados os indivíduos e suas características a serem estudadas no espaço de busca como uma sequência de símbolos gerados a partir de um alfabeto finito é o primeiro passo para aplicação de AGs a um problema qualquer (TANOMARU, 1995). Para desenvolver AGs de forma computacional, deve ser possível expressar os dados envolvidos para solução do problema, em uma linguagem computacional (SIERAKOWSKI, 2006).

As formas de representação da população em linguagem computacional são geralmente as seguintes: representação binária, codificação gray, representação real e representação inteira (SIERAKOWSKI, 2006, LINDEN, 2008a).

A representação binária, representação originalmente proposta por Holland (1975), utiliza apenas os números binários (0 e 1) para a representação das variáveis. Por isso, em problemas originalmente com dados em representação numérica em real, podem ser necessárias operações de codificação e decodificação real-binário. Ou seja; um procedimento de transformação do valor real da variável a ser analisado para a codificação binária e vice-versa. Em casos, onde o problema abordado é inerentemente binário, os processos de codificação e decodificação são desnecessários (LINDEN, 2008a).

A principal dificuldade existente em se trabalhar com a codificação binária é o fato de se necessitar de uma grande cadeia para se conseguir uma boa precisão. Outro problema é a existência de *Hamming cliffs*, ou seja, grandes diferenças nas cadeias de bits que codificam dois números inteiros próximos (por exemplo, os números 511 – 0111111111 e 512 – 1000000000) (AVILA, 2002).

Na codificação Gray, de forma semelhante à codificação binária, apenas os elementos 0 e 1 são utilizados para representar as variáveis sendo analisadas. A codificação Gray foi desenvolvida de forma a solucionar o problema de *Hamming cliffs*, isso ocorre devido ao fato de quaisquer dois números inteiros subsequentes codificados segundo o código de Gray variem em apenas um bit a sua codificação (GOLDBARG; LUNA, 2000).

A representação real opera diretamente com os números reais. A representação real surgiu como uma opção para a aplicação em problemas complexos ou problemas com grandes espaços de busca, onde se reduziria o custo computacional do processo de codificação e decodificação. Esta forma de representação se tornou atraente pela redução do custo computacional, e principalmente devido a não apresentar necessidade do uso dos processos de codificação e decodificação (GOLDBARG; LUNA, 2000).

A representação inteira utiliza números inteiros para representar os indivíduos da população. Esta forma de representação é normalmente utilizada em problemas em que as soluções são representadas através de grafos, ou seja, em problemas combinatórios. Neste caso, os números representam os nós do grafo, e o cromossomo representa a ordem através da qual os nós são percorridos (GOLDBARG; LUNA, 2000).

A definição da representação, aliada aos limites máximos e mínimos podem definir a precisão desejada, o número de símbolos e formatos necessários a representar cada variável e ainda delimitar a área de busca.

3.13.4. Função Objetivo

A função que se deseja otimizar, na terminologia dos AGs, é denominada de função objetivo, função de otimização ou ainda função custo. Esta função é aplicada para cada membro da população, outorgando a cada indivíduo um valor independente e apropriado segundo a própria função e que seja representativo do membro em relação ao problema (GROSKO *et al.*, 2006; LINDEN, 2008a).

3.13.5. Função Aptidão

A função de aptidão ou *fitness* é uma função que aplicada, representa uma

métrica direta do desempenho do indivíduo da população diante do problema (SIERAKOWSKI, 2006). Este valor é que qualificará o indivíduo em direção a solução do problema, e é também denominado grau de aptidão. Indivíduos com melhores valores para o grau de aptidão possuem chances maiores no processo de seleção objetivando o processo de reprodução, resultando na maior probabilidade em transmitir o seu material genético as gerações seguintes. Em circunstâncias especiais, a função aptidão pode ser a própria função objetivo (LINDEN, 2008a).

3.13.6. Fluxo básico

Geralmente existem apenas dois componentes principais utilizados no AG, que dependem do problema a ser resolvido: a representação do problema através da função objetivo e a função de aptidão (WHITLEY, 1994). Os outros componentes que completam este processo são: população e os operadores de seleção, cruzamento (*crossover*) e a mutação (HAUPTY *et al.*, 2004). AGs tem como base geral que cada indivíduo de uma população se apresenta como candidato a solução de um problema, onde o ambiente representativo do problema está definido pela função de otimização (DIAS *et al.*, 1998).

Os AGs são compostos por uma população de indivíduos e um conjunto de operadores sobre a população. De acordo com a inspiração de teorias evolucionárias, segundo as quais os AGs foram desenvolvidos, os elementos mais bem adaptados ao seu meio têm maior probabilidade de sobreviver e de se reproduzir, transmitindo o seu material genético para as novas gerações (SIERAKOWSKI, 2006).

Um AG é composto basicamente por quatro etapas (SIERAKOWSKI, 2006): (1) Geração de uma população inicial; (2) Avaliação de cada um dos elementos da população; (3) Seleção dos melhores elementos da população; (4) Manipulação

genética, através dos operadores de cruzamento e mutação, de forma a criar uma nova população.

As etapas de 2, 3 e 4 devem ser repetidas até que se encontre uma situação que indique sucesso na busca com identificação de solução satisfatória, ou ocorra condição predefinida ao encerramento, como número máximo de gerações, ou tempo de processo, ou ainda ocorra situação que inviabilize o processo de busca. Nestes casos, elege-se a solução entre os melhores indivíduos encontrados no processo. Pode ser definida uma única condição das apresentadas ao encerramento do processo de busca em um AGs ou ainda consorciar algumas destas condições ou ainda outra condição estabelecida.

Abaixo um Pseudo-código de um AG simples é apresentado

```
Seja  $S(t)$  a população de cromossomos na geração  $t$ .  
 $t \leftarrow 0$   
inicializar  $S(t)$   
avaliar  $S(t)$   
enquanto o critério de parada não for satisfeito  
faça  
     $t \leftarrow t+1$   
    selecionar  $S(t)$  a partir de  $S(t-1)$   
    aplicar cruzamento sobre  $S(t)$   
    aplicar mutação sobre  $S(t)$   
    avaliar  $S(t)$   
fim-enquanto
```

3.13.7. Inicialização

Em geral, o procedimento para obtenção da população inicial é aleatório buscando-se uma distribuição uniforme dentro do espaço de busca, e observando-se as exigências e restrições do problema proposto. Contudo, pode ocorrer algum processo heurístico que garanta à existência de alguns bons candidatos a solução do problema previamente conhecido. É importante e desejável que a população inicial seja representativa e cubra a maior área possível do espaço de busca (TANOMARU, 1995; SIERAKOWSKI, 2006). Estudos já comprovaram que a população inicial não é um fator crítico ao sucesso do processo, desde que a mesma possua cromossomos suficientemente distribuídos no espaço de busca (SIERAKOWSKI, 2006).

3.13.8. Avaliação

A avaliação da população é feita baseada na aplicação das funções Objetivo e Aptidão. Aplicada a função aptidão, o peso ou valor alcançado por cada indivíduo representa a avaliação do mesmo no contexto do problema ou o seu grau de aptidão (LINDEN, 2008a).

3.13.9. Seleção

O operador de seleção dos AGs simula o processo de seleção natural existente na natureza e proposta por Darwin (1859), onde as maiores chances ficam com os indivíduos que possuam os maiores graus de aptidão. Este processo define quais elementos devem ser submetidos aos operadores de recombinação ou *crossover* e de mutação, e conseqüentemente aqueles que devem ter suas características perpetuadas à próxima geração. A literatura sobre AGs apresentam diversos métodos que podem ser aplicados ao processo de seleção sendo os mais tradicionais os

métodos da Roleta, Torneio, seleção por amostragem determinística, seleção de amostragem aleatória e seleção de amostragem estocástica, sendo os métodos da roleta e torneio os mais comumente usados ou apresentados na literatura científica (SIERAKOWSKI, 2006).

3.13.10. Recombinação

Nos AGs, o operador de recombinação, também denominado de *crossover* ou cruzamento, simula o processo de reprodução sexuada que ocorre na natureza e possibilita a transmissão de material genético de indivíduos para as gerações futuras.

Um parâmetro importante para o operador de recombinação refere-se ao que comumente é denominado de taxa de *crossover*. Este define a probabilidade para que ocorra ou não a recombinação. Esta taxa pode ser predefinida (fixa) ou variar durante o processamento do AG, e é comum a utilização de taxas altas, pois o processo de recombinação é desejável dentro dos princípios do AG, e comumente se adotam probabilidade acima de 70% para este operador (LINDEN, 2008a).

Existem várias técnicas de *crossover* que podem ser adotadas e que definem como deve ocorrer a recombinação genética, ou a transmissão do material genético dos pais as novas gerações. Estas técnicas, dependendo da complexidade do problema, podem ser pré-estabelecidas ou definidas durante a execução das rotinas dos AGs. As técnicas mais comuns são o *crossover* de um ou dois pontos de corte.

Fundamentalmente, a finalidade deste processo é propiciar que, a partir de indivíduos selecionados (pais), sejam gerados novos indivíduos (filhos), onde cada um deles apresente material genético dos pais. O *crossover* exemplificado na Figura 1 é o de ponto de corte único, descrito como o mais utilizado na literatura.

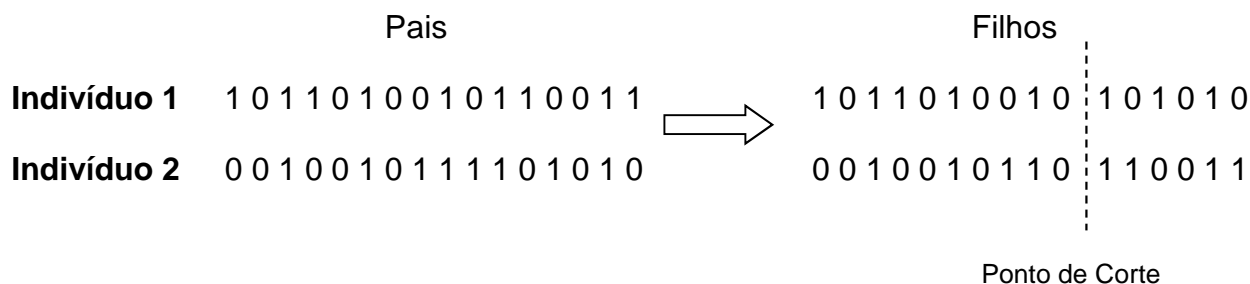


Figura 1. Exemplo de *crossover* no Algoritmo Genético

No entanto, podem ser efetuados *crossover* com 2 pontos de corte ou mais. Alguns autores apresentam como opção o *crossover* uniforme, que utiliza uma máscara e um algoritmo para definir os *bits* de um pai que são transmitidos ao filho.

Outro aspecto importante que deve ser tratado pelos AGs diz respeito à substituição da população antiga pela nova população, podendo isto ocorrer de forma total ou parcial, sendo estabelecidos previamente os critérios que definem como isto deve ocorrer.

3.13.11. Mutação

O operador de mutação nos AGs tem por finalidade introduzir variações aleatórias no material genético da população, de forma a aumentar a diversidade e ampliar o campo de busca de soluções e ainda evitar a convergência prematura. Diversos métodos, em geral probabilísticos, podem ser utilizados para identificar quando e qual gene sofrerá a mutação (Figura 2).

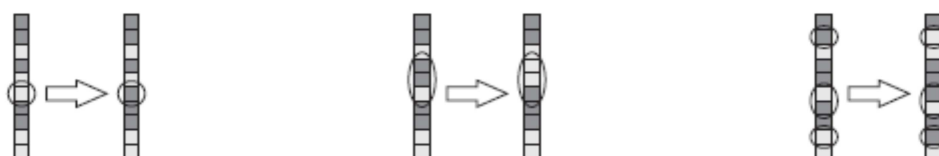


Figura 2. Exemplos de métodos de operações de Mutação no Algoritmo Genético (WEISE, 2009).

Em geral utilizam-se taxas baixas de mutação (máximo de 5%), pois o uso de taxas grandes de mutações propiciará mudanças maiores nos cromossomos o que representará a criação de vários indivíduos em pontos distantes aos que se consideravam próximos dos ótimos, ou seja, praticamente a busca se torna aleatória e não tira proveito das informações correntes ou passadas. A experiência e o próprio processo poderão ajudar a encontrar as melhores taxas e estratégia para implementar o operador de mutação (LINDEN, 2008a).

3.13.12. Critério de parada

O ideal é que todo AG interrompa o processamento apenas quando alcance a solução ótima. No entanto, em muitos casos não se consegue alcançar uma solução ótima ou nem sempre existe uma forma de identificar se uma solução a melhor dentre todas, ou seja; nem sempre se pode ter certeza de ter alcançado um ótimo global, podendo ser aquele um ótimo local. Sendo assim devem ser estabelecidos critérios de parada de tal forma que mesmo não sendo identificado pelo algoritmo o melhor indivíduo, exista a possibilidade de identificar o melhor alcançado até o momento da interrupção (LINDEN, 2008a).

Como critérios de parada de um AG podem ser adotados um número máximo de gerações, um tempo limite de processamento, identificação da estagnação da evolução populacional definido pela não melhoria significativa da população a partir de uma determinada geração e durante várias gerações consecutivas, ou outros critérios podem ser definidos conforme a necessidade do problema. Ainda existe a possibilidade de utilizar mais de um destes critérios ou outros simultaneamente interrompendo o processo quando o primeiro ocorra (LINDEN, 2008a; WEISE, 2009).

4. REFERÊNCIAS

ABADIE, E. Apostila de Processos de Refino I - Craqueamento Catalítico. Petrobrás / RH/UC/DTA, 2003. Disponível em: <http://www.tecnicodepetroleo.ufpr.br/apostilas/petrobras/processos_de_refino.pdf>. Acesso em: jun. 2013.

ABOUSEOUD, M.; YATAGHENI, A.; AMRANE, A.; MAACHI, R. Effect of pH and salinity on the emulsifying capacity and naphthalene solubility of a biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Hazardous Materials**, Rennes, n. 180, p. 131-136, 2010.

ABRAHAM, W. R.; MEYER, H.; YAKIMOV, M. Novel glycine containing glucolipids from the alkane using bacterium *Alcanivorax borkumensis*. **Biochemical Biophysical Acta**, v. 1393, p. 57-62, 1998.

ADAMASSU, W., KORUS, R. A. Engineering of bioremediation processes: needs and limitations. In: Crawford, R.; Crawford, D. Ed. Bioremediation: Principles and Applications – Biotechnology Research Series: 6. Cambridge University Press, 1996. p. 13-34.

AELION, C.; BRADLEY, P. M. Aerobic biodegradation potential of subsurface microorganisms from a jet fuel-contaminated aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 37, p. 57-63, 1991.

ALBUQUERQUE, C. D.C.; FILETI, A. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Optimizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 575-583, 2006.

ALEIXO, L. A.; TACHIBANA, T.I.; CASAGRANDE, D. Poluição por Óleo - Forma de introdução do petróleo e derivados no ambiente. **Revista Integração**, n. 49, p. 159-166, 2007. Disponível em: <<http://mralexandre.files.wordpress.com/2010/04/poluicao-por-petroleo.pdf>>. Acesso em: 19 jun. 2010

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. Degradation and mineralization of petroleum by two bacteria isolated from coastal waters. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 14, n. 3, p. 297-308, 1972.

ATLAS, R. M. Bioremediation of Petroleum Pollutants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 317-327, 1995.

AVILA, S. L. **Algoritmos Genéticos Aplicados na Otimização de Antena Refletoras**. 2002. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) - Universidade Federal do Santa Catarina. Florianópolis, 2002.

BACOSA, H.; SUTO, K.; INOUE, C. Preferential degradation of aromatic hydrocarbons in kerosene by a microbial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, n. 64, p. 702-710, 2010.

BANAT, I. M. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus sp.* **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 6, p. 591-594, 1993.

BANKAR, A. V.; KUMAR, A. R.; ZINJARDE, S. S. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 847-865, 2009.

BARTH, G.; GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Microbiology Review**, v. 19, p. 219-237, 1997.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B.; FRANKBERG-JÚNIOR, W. T. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, n. S1, p. 65-68, 2003.

BERTRAND, J. C.; BIANCHI, M.; MALLAH, M. A.; ACQUAVIVA, M.; MILLE, G. Hydrocarbon biodegradation and hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in seawater as a function of sodium chloride concentration. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 168, n. 1, p. 125-138, 1993.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry **Talanta**, v. 76, p. 965-977, 2008.

BHATTACHAYRA, S. S.; KARMAKAR, S.; BANERJEE, R. Optimization of laccase mediated biodegradation of 2,4-dichlorophenol using genetic algorithm. **Water Research**, v. 43, p. 3503-3510, 2009.

BOGUSLAWSKA-WAS, E.; DABROWSKI, W. The seasonal variability of yeasts and yeast-like organisms in water and bottom sediment of the Szczecin Lagoon, **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 203, n. 5-6, p. 451-458, 2001.

BONACELLA, P. H.; MAGOSSO, L. R. **A poluição das águas**. 10 ed. São Paulo: Moderna, 66p., 1990.

BR DISTRIBUIDORA. **Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ**. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

BUTINAR, S. S.; SPENCER-MARTINS, I.; GUNDE-CINERMAN, N. Yeast diversity in hypersaline habitats. **FEMS Microbiology Letters**, v. 224, p. 229-234, 2005.

CARAPETO, C. **Poluição pelo Petróleo**. Disponível em <<http://www.antoniofonseca.com/poluicao/Li%E7oes/Petroleo.pdf>>. Acesso em: jun. 2010

CARDOSO, A. M. **Sistema de Informação para planejamento e resposta a incidentes de poluição marítima por derramamento de petróleo e derivados**. 2007. 148 f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Planejamento Energético) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007

CHI, Zhenming; FANG, Yan. Exopolysaccharides from marine bacteria. **Journal of Ocean University of China**, China, v. 4, n. 1, p. 67-74, 2005.

COELHO, M. A. Z.; AMARAL, P. F. F.; BELO, I. *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, v. 2, p. 930-940, 2010.

COUTINHO, R. C.; GOMES, C. C. **Técnicas para remediação de aquíferos contaminados por vazamento de derivados de petróleo em postos de combustíveis**. In: XVII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos, São Paulo, 2007. Disponível em: <http://www.abrh.org.br/novo/xvii_simp_bras_rec_hidric_sao_paulo_053.pdf>. Acesso em: ago. 2012.

CRAPEZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M. G. S.; PEREIRA, D. C. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, v. 30, p. 32-37, 2002.

DARWIN, C. **The Origins of Species**. London: London, 1859.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 04, n. 6, p. 1675-1684, 2008a.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, S. Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. **Chemosphere**, v. 72, n. 9, p. 1229-1234. 2008b.

DESAI, J. D; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47-64, 1997.

DIAS, J.; BARRETO, J. Algoritmo genético: inspiração biológica na solução de problemas - uma introdução. **Revista Marítima Brasileira - Suplemento Especial, Pesquisa Naval**, n. 11, p. 105-128, 1998.

DORIGO, M.; MANIEZZO, V.; COLORNI, A. Ant System: Optimization by a Colony of Cooperating Agents. **IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics – Part B: Cybernetics**, n. 26, p. 29-41, 1996.

DREW, D. **Processos Interativos Homem-Meio Ambiente** (4ª Edição ed.). Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil: Bertrand Brasil, 1998.

DUJON, B. *et al.* Genoma Evolution in Yeasts. **Nature**, v. 430, ed. 6995, p. 35-44. 2004.

FRANCISCO, W. C. Querosene. **Brasil Escola**. Disponível em: <<http://www.brasilecola.com/geografia/querosene.htm>>. Acesso em: mai. 2011.

FRANCO-LARA, E.; LINK, H.; WEUSTER-BOTZ, D. Evaluation of artificial neural networks for modelling and optimization of medium composition with a genetic algorithm. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2200-2206, 2006.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação - Aspectos biológicos e técnicos de biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 34, p. 36-43, 2005.

GOLDBARG, M. C.; LUNA, H. P. **Otimização combinatória e programação linear: modelos e algoritmos**. Ed. Campus, Rio de Janeiro, 2000.

GOUDA, M. K.; OMAR, S. H.; CHEKROUD, Z. A.; ELDIN, H. M. N. Biorremediation of kerosene I: A case study in liquid media. **Chemosphere**, n. 69, p. 1807-1814, 2007.

GROSKO, A. P.; GORSKI, J. R.; DIAS, J. S. Algoritmo Genético: Revisão Histórica e Exemplificação. **X Congresso Brasileiro de Informática em Saúde**. Florianópolis, 2006.

GURGEL, A. M.; MEDEIROS, Ana Catarina Leite Vêras; ALVES, P. C.; SILVA, M. J.; GURGEL, I. G. D.; AUGUSTO, L. G. S. Framework dos cenários de risco no contexto da implantação de uma refinaria de petróleo em Pernambuco. **Ciência & Saúde Coletiva** (Online), Recife, v. 14, p. 2027-2038, 2009. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232009000600010&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: jan. 2015.

HARROP, M. H. V.; TAKAKI, G. M. C.; GUSMÃO, N. B. New Bioemulsifiers Produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and Babassu Oil as Carbon Sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brasil, v. 34, n. 2, p. 120-123, 2003.

HASSANSHAHIAN, M.; TEBYANIAN, H.; CAPPELLO, S. Isolation and characterization of two crude oil-degrading yeast strains, *Yarrowia lipolytica* PG-20 and PG-32, from the Persian Gulf. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 7, p. 1386-1391, 2012.

HAUPTY, R.; HAUPTY, S. **Practical genetic algorithms, 2nd Edition**. A John Wiley & Sons Inc. Publications, 2004.

HOLLAND, J. H. **Adaptation in Natural and Artificial Systems**. Michigan, Estados Unidos: University of Michigan Press, 1975.

IRWIN, R. J.; VAN MOUWERIK, M.; STEVENS, L.; SEESE, M. D.; BASHAM, W. **Environmental Contaminants Encyclopedia. Kerosene Entry**. National Park Service, Water Resources Division, Water Operating Branch. Oakridge Drive, Suite Fort Collins, Colorado 80525, 1997.

JACQUES, R. J. S.; SEMINOTI, R.J.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.

KACZOREK, E.; URBANOWICZ, M.; OLSZANOWSKI, A. The influence of surfactants on cell surface properties of *Aeromonas Hydrophila* during diesel oil biodegradation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, n. 81, p. 363-368, 2010.

KIM, J. T.; KANG, S. G.; WOO, J. H.; JEONG, B. C.; KIM, S. J. Screening and its potential application of *lipolytic* activity from a marine environment: characterization of a novel esterase from *Yarrowia lipolytica* CL180. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74; p. 820-828, 2007.

KOLESNIKOVAS, C. **Avaliação do Risco Toxicológico para Hidrocarbonetos Totais de Petróleo em Forma Fracionada Aplicada à Gestão e Monitoramento de Água Subterrânea em um Complexo Industrial.** 2006. 250 f. Tese (Doutorado em Recursos Minerais e Hidrogeologia) - Instituto de Geociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.

LEE, K.; LEVY, M. Biodegradation of Petroleum in the Marine Environment and its Enhancement. **Environment Sciency Technology**, v. 22, p. 217-243, 1988.

LEE, K.; PARK, Jin-Won; AHN, Ik-Sung. Effect of additional carbon source on naphthalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7. **Journal of Hazardous Materials**, v. 105, ed. 1-3, p. 157-167, 2003.

LEME, D. M.; MARIM-MORALES, M. A. **Avaliação da Qualidade de Águas Impactadas por Petróleo por Meio de Sistema - Teste Biológico (*Allium cepa*) - Um Estudo de Caso.** In: 4o PDPETRO, p. 6.2.0086-1-1 - 6.2.0086-1-9, Campinas, 2007.

LIBES, S. M. **The fate of pollutants in the coastal ocean. An introduction to marine biogeochemistry.** A John Wiley & Sons Inc., 1992.

LINDEN, R. **Algoritmo Genético: Uma importante ferramenta da Inteligência Computacional.** Rio de Janeiro - RJ: BraSport Livros e Multimídea Ltda, 2008a.

LINDEN, R. Algoritmos genéticos na Indústria do petróleo: Uma Visão Geral. **Revista da Engenharia de Instalação no Mar**, n. 1, p. 1-7, 2008b.

MANEERAT, S. Biosurfactants from marine microorganisms. **Songklanakarín Journal Science Technology**, Songkhla, Thailand, n. 27, p. 1263-1272, 2005.

MANEERAT, S.; BAMBA, T.; HARADA, K.; KOBAYASHI, A.; YAMADA, H.; KAWAI, F. A novel crude oil emulsifier secreted in the culture supernatant of a marine bacterium, *Myroides* sp. strain SM1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, ed. 2, p. 254-259, 2006.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel.** 2006. 162 f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas – Rio Claro, 2006.

MATSUURA, Y. The hole of the ocean in feeding three hundred million tons weight of human beings. **Global Change Open Science Conference**, n. 1. Amsterdam: IGBP Secretary, 2001.

McCARTY, P.; GOLTS, M.; HOLPKINS, G. Full-scale evaluation of in-situ cometabolic degradation of TCE in groundwater through toluene injection. **Environmental Science and Technology**, v. 32, p. 88-100, 1998.

MIRANDA, M. **Algoritmos Genéticos: Fundamentos e Aplicações**. Disponível online em: <<http://www.nce.ufrj.br/GINAPE/VIDA/alggenet.htm>>. Acesso em: abr. 2011.

MITCHELL, M. **An Introduction to Genetic Algorithms**. Cambridge: MIT Press, 1996.

MOHAJERI, L.; AZIZ, H. A.; ISA, M. H.; ZAHED, M. A. A statistical experiment design approach for optimizing biodegradation of weathered crude oil in coastal sediments. **Bioresource Technology**, v. 101, Ed. 3, p. 893-900, 2010.

MOREIRA, F. S. **A integração refino petroquímica como alternativa para atendimento do crescente mercado de petroquímicos**. 2008. 168 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. **Response surface methodology**: process and product optimization using designed experiments. 2nd Ed. New York: John Wiley Professional, 1995. (Wiley Series in Probability and Statistics).

NERURKAR, A. S.; HINGURAO, K. S.; SUTHAR, H. G. Bioemulsifiers from marine microorganism. **Jornal of Scientific & Industrial Research**. v. 68, p. 273-277, 2009.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova** (Impresso), São Paulo, v. 25, ed. 5, p. 772-776, 2002.

PASSERI, S.; SCHMIDT, M.; HAFFNER, T.; WRAY, V.; LANG, S.; WAGNER, F. Marine biosurfactants. IV. Production, characterization and biosynthesis of an anionic glucose lipid from the marine bacterial strain MM1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 281-286, 1992.

PERFUMO, A.; BANAT, I. M.; CANGANILLA, F.; MARCHANT, R. Rhamnolipid production by a novel thermotolerant hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02-1. **Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 132-138, 2006.

PERFUMO, A.; RANCICH, I.; BANAT, I. M. Possibilities and challenges for Biosurfactantes use in petroleum industry. **Biosurfactantes: Advances in Experimental Medicine and Biology**, Ed. Springer New York, v. 672, p. 135-157, 2010a.

PERFUMO, A.; SMYTH, T.; MARCHANT, R.; BANAT, I. Production and role of biosurfactants and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates. **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**, Ed. Springer Berlin Heidelberg, p. 1501-1512, 2010b.

PETROBRAS. PETROBRAS – Fatos e Dados (institucional). Disponível em: <<http://fatosedados.blogspot.com.br/2012/08/01/graca-foster-apresenta-plano-de-negocios-no-ibef-rj/email/>> 2012. Acesso em: ago. 2012.

PRADO, J. R.; SARAMAGO, S. F. P. Otimização por Colônia de Partículas. **Famat em Revista** - Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Uberlândia, n. 04, p. 87-103, 2005. Disponível em: <http://www.portal.famat.ufu.br/sites/famat.ufu.br/files/Anexos/Bookpage/Famat_Revista_04.pdf>. Acesso em: set. 2012.

PRINCE, R. C.; BRAG, J. R. Shoreline bioremediation following the Exxon Valdez oil spill in Alaska. **Bioremediation Journal**, v. 1, p. 97-104, 1997.

RAIGER LUSTMAN, L. J.; LÓPEZ, N. I. Los Biosurfactantes y la industria petrolera. **Revista Química Viva**, v. 8, n. 3, p. 146-161, 2009.

RAZA, Z. A.; KHAN, M. S.; KHALID, Z. M. Evaluation of distant carbon sources in biosurfactant production by gamma ray-induced *Pseudomonas putida* mutant. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 686-692, 2007a.

RAZA, Z. A.; REHMAN, A.; KHAN, M. S.; KHALID, Z. M. Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. **Biodegradation**. v. 18, p. 115-121, 2007b.

REISFELDT, A.; GUTNICK, D.; ROSENBERG, E. Microbial degradation of crude oil: factors affecting the dispersion in sea water by mixed and pure cultures. **Applied Microbiology**, v. 24, p. 363-368, 1972.

ROEVA, O. A modified genetic algorithm for a parameter identification of fermentation processes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**. v. 20, p. 202-209, 2006.

SÁENZ, T. W.; SOUZA-PAULA, M. C. **Convergência Tecnológica: 2008. Brasília: Centro, 2008.**

SANTOS, M. **Avaliação de Risco a Saúde Humana por Exposição Ambiental a Hidrocarbonetos Aromáticos Monocíclicos - Estudo de Caso**, 2009. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília. Brasília (DF), 2009.

SARAMAGO, Sezimária F. Pereira. **Algoritmos Genéticos: a otimização aplicando a teoria da evolução**. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2013. Disponível em: jul. 2015.

SATPUTE, Surekha K. et al. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 4, p. 436-450, 2010.

SCHULZ, D. et al. Marine biosurfactants, I. Screening for biosurfactants among crude oil degrading marine microorganisms from the North Sea. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 46, n. 3-4, p. 197-203, 1991.

SCHWEFEL, H. P.; TAYLOR, L. Evolution and Optimum Seeking. A **John Wiley & Sons Inc.**, p. 87-88, 1994.

SHABIR, G.; AFZAL, M.; ANWAR, F.; TAHSEEN, R.; KHALID, Z. M. Biodegradation of kerosene in soil by a mixed bacterial culture under different nutrient conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 61, n. 2, p. 161-166, 2008.

SIERAKOWSKI, C. A. **Inteligência Coletiva Aplicada a Problemas da Robótica Móvel**. 2006. 160 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção e Sistemas) - Universidade Católica do Paraná. Curitiba, 2006.

SILVA, P. R. **Transporte marítimo de petróleo e derivados na costa brasileira: Estrutura e implicações ambientais**. 2004. 160 f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Planejamento Energético) UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, Rio de Janeiro, 2004.

SOKOLOV, S.; GAFAROV, A.; VINOGRADOVA, E.; KOSHELEVA, I.; BORONIN, A.; ROMANTSCHUK, M. Microbial community composition of baltic seawater and natural sorbent and their alterations during biodegradation of oil hydrocarbons in mesocosms. In: **4th European Bioremediation Conference**, Chania, Crete, 2008.

SONG, Hong-Gyu; WANG, Xiaoping; BARTHA, Richard. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 652-656, 1990.

SOUZA, F. A. S. D. **Biodegradação de Óleo Diesel por *Candida lipolytica* em Água do Mar**. 2009. 175 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) - Universidade Católica de Pernambuco. Recife, 2009.

SOUZA, F. A. S. D.; SALGUEIRO, A. S.; ALBUQUERQUE, C. D. C. Production of bioemulsifiers by *Yarrowia lipolytica* in seawater using diesel oil as the carbon source. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 01, p. 61-67, 2012.

SPEIGHT, J. G. **Production, properties and environmental impacts of hydrocarbon fuel conversion**: subtítulo. In: KHAN, M. R. *Advances in Clean Hydrocarbon Fuel Processing: Science and Technology*. Cambridge, UK: Wood Head Publishing, p. 54-82, 584p, 2011.

STRUJAK, D.; VIDAL, C. M. Poluição das águas: Revisão da Literatura. **Revista Eletrônica Lato Sensu**, ano 2, n. 1, p. 11-26, 2007.

TABATABAEE, A.; ASSADI, M. M.; NOOHI, A. A.; SAJADIAN, V. A. Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. **Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 2, n. 1, p. 6-12, 2005.

TANOMARU, J. Motivação, Fundamentos e Aplicações de Algoritmos Genéticos. **Publicação de Tutorial II Congresso Brasileiro de Redes Neurais - III Escola de Redes Neurais**, p. 373-403, Curitiba, 1995.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BANAT, I. Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3366-3372, 2011.

THEVENIEAU, F.; BEOPOULOS, A.; DESFOUGERES, T.; SABIROVA, J.; ALBERTIN, K.; ZINJARDE, S. S.; NICAUD, J.-M. **Uptake and assimilation of hydrophobic substrates by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica***. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, ed. K. N. Timmis (Berlin: Springer), p. 1513-1527, 2010.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 441-446, 2004.

VIAS, T. K.; DAVE, B.P. Effect of addition of nitrogen, phosphorus and potassium fertilizers on biodegradation of crude oily marine bacteria, **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 1, p. 143-150, 2010.

WANG, N. F.; TAI, K. Target matching problems and an adaptive constraint strategy for multiobjective design optimization using genetic algorithms. **Computers and Structures**, v. 88, p. 1064-1076, 2010

WEINER, R. M. Biopolymers from marine prokaryotes. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 10, p. 390-394, 1997.

WEINER, R. M.; COLWELL, R.R.; JARMAN, R.N.; STEIN, D.C.; SOMERVILLE, C.C.; BONAR, D.B. Applications of Biotechnology to the Production, Recovery and Use of Marine Polysaccharides. **Nature Biotechnology**, n. 3, n, 10, p. 899-902, 1985.

WEISE, T. **Global Optimization Algorithms – Theory and Application**. Disponível em: <<http://www.it-weise.de/>>. 2009. Acesso em: ago. 2012.

WHITLEY, D. A genetic algorithm tutorial. **Springer Science + Business Media B.V., Formerly Kluwer Academic**, p. 65-85, 1994.

WETLER- TONINI, R. M.C.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e Biorremediação de Compostos do Petróleo por Bactérias: Revisão. **Oecologia Australis**, v. 14, p. 1025-1035, 2010.

ZAFAR, M.; KUMAR, Shashi; KUMAR, Surendra. Optimization of naphthalene biodegradation by a genetic algorithm based response surface methodology. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 89-99, 2010.

ZAHED, A. M.; AZIZ, H. A.; ISA, M. H.; MOHAJERI, L.; MOHAJERI, S. Optimal conditions for bioremediation of oily seawater. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 9455-9460, 2010.

ZIOLLI, R. L. Aspectos ambientais envolvidos na poluição marinha por petróleo. **Revista Saúde e Ambiente (UNIVILLE)**, v.3, n. 2, p. 32-41, 2002.

ZINJARDE, S. S.; PANT, A. A. Hydrocarbon degraders from tropical marine environments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 2, p. 118-122, 2002.

ZINJARDE, S. S.; KALE, B. V.; VISHWASRAO, P. V.; KUMAR, A. R. Morphogenetic

behavior of tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* in response to hydrophobic substrates. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 18, n. 9, p. 1522-1528, 2008.

CAPÍTULO II

Otimização de biodegradação de querosene em água do mar por *Candida lipolytica* UCP 0988 usando abordagem híbrida baseada em metodologia de superfície de resposta, funções de desajustabilidade e algoritmos genéticos.

Rivaldo Cassimiro Junior^{1,5}, Jupiranan Ferreira da Silva^{1,5}, Galba Maria de Campos Takaki^{1,3,6}, Clarissa Daisy da Costa Albuquerque^{1,2,5*}

¹*Programa de Pós-Graduação Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.*

²*Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.*

⁴*Núcleo de Informática e Computação, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE, Brasil..*

⁵*Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.*

**Autor para quem a correspondência deve ser endereçada: Clarissa Daisy da Costa Albuquerque, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Rua Nunes Machado, 42, Bloco J, Térreo, Boa Vista, CEP: 50050-590, Recife, PE, Brasil. Phone: +55 81 21194017; Fax: +55 81 21194043. E-mail addresses: cdaisy@unicap.br*

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico Bioresource Technology.

Resumo

Candida lipolytica UCP 0988 revelou habilidade para usar querosene como única fonte de carbono e produzir biossurfactantes em água do mar suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo. Metodologia de superfície de resposta, funções de desejabilidade e algoritmos genéticos foram usados para modelar e otimizar meios para biodegradação de querosene e produção de biossurfactantes por *Candida lipolytica* UCP 0988 em água do mar. Modelos quadráticos para biomassa e a tensão superficial foram desenvolvidos e as condições ambientais (pH e concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio) foram otimizadas. A abordagem híbrida usando metodologia de superfície de resposta associada a funções de desejabilidade e algoritmos genéticos provou ser uma alternativa eficiente em relação à abordagem tradicional usando apenas metodologia de superfície de resposta.

Palavras Chaves: Otimização multiresposta, Otimização multiobjectivo, biossurfactante, bioemulsificante, biorremediação, Planejamento Composto Central

1. Introdução

A convergência tecnológica entre ciência da computação, neurociência, nanotecnologia e biotecnologia tem contribuído para resolução de problemas e otimização de soluções nas mais diversas áreas do conhecimento, inclusive na área de biorremediação de ambientes contaminados por petróleo e derivados. Métodos computacionais bioinspirados como Redes Neurais Artificiais (RNA) e Algoritmos Genéticos (AG) têm sido usado com sucesso em modelagem e otimização de meios de cultivo para biodegradação de hidrocarbonetos e para produção de diversos bioprodutos, visando aumento de eficiência e redução de custos. Especificamente, na área de processos de produção de biosurfactantes e de biodegradação de petróleo e derivados, a busca por redução de tempo e custos tem estimulado o uso de otimização baseada tanto em técnicas convencionais - como Metodologia de Superfície de Resposta ou MSR (Albuquerque *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008; Rufino *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009; Luna *et al.*, 2011; Zahed *et al.*, 2010a; Zahed *et al.*, 2010b; Kiran *et al.*, 2010; Mohajeri *et al.*, 2010) - quanto em abordagens híbridas bioinspiradas, associando AG e MSR e/ou AG e RNA (Desai *et al.*, 2006; Pal *et al.*, 2009; Sivapathasekaran *et al.*, 2010; Bhattachayra *et al.*, 2009; Zafar *et al.*, 2010).

A MSR é uma das técnicas mais aplicadas em otimização unirresposta (OUR) de bioprocessos, inclusive, de processos de biodegradação de petróleo e derivados (Agary *et al.*, 2012, Mohajeri *et al.*, 2010). Entretanto, quando a MSR é associada a métodos de otimização locais determinísticos, como métodos de subida/descida de encosta pela trilha mais íngreme (métodos de máxima inclinação ascendente/descendente), baseados em gradiente (GD) - requer continuidade e diferenciabilidade da função. Este tipo de associação é um fator limitante da aplicação da MSR, haja vista que as superfícies de respostas de bioprocessos, em geral, são altamente não lineares, multidimensionais, multimodais e não necessariamente suaves e contínuas. A associação de MSR a técnicas evolutivas como AG, que usam regras probabilísticas, tem mostrado ser uma abordagem adequada para superação deste problema e também da seleção de soluções locais sub-ótimas, já que AG trabalham com uma população diversificada de soluções candidatas (indivíduos ou cromossomos) e um conjunto de operações de exploração (seleção)

e exploração (*crossover* e mutação) que dispensam o cálculo de derivadas, sendo capazes de tolerar descontinuidades e avaliações de funções ruidosas (Golbderg, 1989; Gaitonde *et al.*, 2008).

Problemas de otimização multirresposta (OMR) são comuns em bioprocessos e geralmente envolvem funções objetivos conflitantes por natureza (Zitzler, Thiele, 1999). O uso de MSR associada a métodos gradientes para resolver este tipo de problema, muitas vezes, apresenta resultados insatisfatórios (Treier *et al.*, 2012). O uso de otimização gráfica através de superposição de superfícies de resposta ou gráficos de contorno é adequado para no máximo duas respostas e em situações nas quais as regiões ótimas estão próximas e permitem intersecção entre si (Myers e Montgomery, 2009). Portanto, várias extensões para MSR têm sido propostas visando encontrar o melhor compromisso entre múltiplas respostas. Uma das mais populares metodologias é a abordagem da função de desejabilidade (FD) (Derringer e Suich, 1980), que adota a estratégia de redução da dimensionalidade para resolver o problema de OMR, ou seja, converte o problema de OMR em problema de otimização de uma única resposta, através do uso de funções de transformações matemáticas convenientes (Treier *et al.*, 2012).

Nas últimas três décadas, diversos algoritmos evolucionários multiobjetivos (AEMO) foram propostos para solução de problemas de otimização multiobjetivo. Como exemplos podem ser citados os algoritmos VEGA (Vector Evaluated Genetic Algorithm), NSGA (Non-Dominate Sorting Genetic Algorithm), MOGA (Multiple Objective Genetic Algorithm), NPGA (Niche-Pareto Genetic Algorithm), NSGAI (Niche-Pareto Genetic Algorithm II), e MPGA (Multi-Population Genetic Algorithm), GPSIFF (Generalized Pareto-based Scale-Independent Fitness Function), MPIGA (Multi-Population Intelligent Genetic Algorithm), entre outros. As mais importantes diferenças entre estes AEMO são as estratégias usadas para gerar as soluções ótimas de Pareto (Su e Hou, 2008).

Como os métodos puramente heurísticos não são os mais eficientes do ponto de vista computacional, a demanda por abordagens híbridas associando métodos de busca local e heurísticas de otimização tem crescido. Entretanto, em laboratórios de biotecnologia, o uso de AEMO é ainda extremamente limitado em relação ao uso de FD para resolver problemas de OMR e em relação ao uso de AG clássico para resolver problemas de OUR. Este fato tem estimulado o desenvolvimento de métodos

híbridos que incorporem a eficiência computacional da OMR baseada em FD com a simplicidade de implementação e a capacidade de escapar de soluções locais sub-ótimas dos AG.

Neste trabalho, diferentes abordagens híbridas para problemas de OUR e OMR em processo de biodegradação de hidrocarbonetos são introduzidas. As abordagens são baseadas na associação de MSR, AG e FD e buscam identificar condições operacionais (pH e concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio) capazes de maximizar a concentração de biomassa e/ou minimizar a tensão superficial em meios para biodegradação de querosene e produção de biossurfactantes em água do mar por *Candida lipolytica* UCP 0988. A análise comparativa dos resultados das diferentes abordagens é usada como ferramenta de apoio à tomada de decisão sobre a condição que melhor representa o compromisso entre os objetivos definidos e conflitantes e as soluções alternativas apresentadas para o problema multiobjectivo proposto.

2. Materiais e Métodos

2.1. Microrganismo e Meio de Manutenção

A levedura *C. lipolytica* UCP 0988 foi obtida da coleção de culturas UCP (Universidade Católica de Pernambuco), abrigada no Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Recife, Pernambuco, Brasil e registrada na Base de Dados do Centro Mundial de Dados para Micro-organismos (World Data Center for Microorganism-WDCM) da Federação Mundial para Coleção de Culturas (*World Federation for Culture Collection*) sob o nº WDCM 927. As colônias de leveduras foram mantidas em 4°C, em tubos de ensaio com o meio YMA (*Yeast Mold Agar*) inclinado, contendo 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 10 g/L de D-glicose, 5 g/L de triptona e 15 g/L de agar. O pH foi ajustado para 5,0 com HCl. Transferências usando técnicas assépticas foram realizadas mensalmente para placas com agar para assegurar a viabilidade celular.

2.2. Querosene

Como fonte de carbono foi utilizado querosene iluminante, comercializado em Posto Petrobrás e supermercados. O querosene iluminante caracteriza-se por possuir hidrocarbonetos parafínicos (70%), aromáticos (20%) e oleofínicos (5%) (FISPQ BR613, 2011).

2.3. Água do Mar

A água do mar usada nos meios de produção foi coletada em recipientes de polietileno com capacidade de 5L em praia próxima à Refinaria Abreu e Lima, no Porto de Suape, Pernambuco, em março de 2011, e após filtração para retirada de sólidos em suspensão, apresentou salinidade igual a 43‰, gravidade específica igual a 1035 kg m⁻³, pH igual a 7,19 e tensão superficial igual a 49,6 mN/m.

2.4. Ensaio de Biodegradação de Querosene e de produção de Biosurfactante

Um planejamento composto central foi utilizado para investigar os efeitos e interações do pH inicial e das concentrações das fontes de nitrogênio (sulfato de amônio) e fósforo (fosfato monobásico de potássio) sobre a concentração de biomassa e da tensão superficial de cultivos com 96 h livres de células de meios de degradação de querosene e produção de bioemulsificante/biosurfactante por *Candida lipolytica* UCP 0988. Os intervalos e níveis das variáveis independentes ou fatores estudados estão apresentados na Tabela 1 e basearam-se em resultados obtidos em trabalhos anteriores (Silva, 2012). Um total de 17 experimentos foi realizado, incluindo 3 repetições no ponto central para obtenção de estimativa da variabilidade em função do erro experimental. Os experimentos foram realizados em ordem sorteada para evitar que erros atípicos fossem relacionados a determinadas combinações. Os componentes dos meios de produção foram dissolvidos em frascos de erlenmeyer de 1000 mL, contendo água do mar estéril, conforme as especificações do planejamento fatorial composto central (Tabela 1). O pH de cada meio também foi ajustado de acordo as especificações da Tabela 1.

A inoculação foi realizada, em câmara de fluxo laminar, na proporção de 5% do volume dos meios de produção, usando suspensão de 10^6 células de *Candida lipolytica* por mL de água do mar estéril. Querosene, com concentração inicial de 30% (v/v), foi adicionado aos frascos depois da inoculação da levedura criando um ambiente com oxigênio limitado. Não foram realizados ensaios de aclimatação da levedura ao querosene. O volume útil dos meios de produção após a inoculação foi igual a 750 mL. Os ensaios de biodegradação de querosene e de produção de bioemulsificantes/biossurfactantes foram realizados durante 96 horas com a temperatura controlada em 28°C e a agitação em 200 rpm.

2.5. Determinação da Concentração da Biomassa

A determinação da concentração de biomassa foi realizada por gravimetria, através de filtração do meio de cultivo em membrana Millipore de 0,22 μm , secagem a 70° C até peso seco e pesagem em balança analítica. O primeiro filtrado foi separado para determinação da tensão superficial. A biomassa foi lavada com uma mistura formada por 5 ml de água destilada e 10 mL de metanol/clorofórmio na proporção 10:1 para extrair o óleo residual. O filtrado foi descartado e a biomassa foi lavada com a mistura até eliminar o querosene residual (Zhou e Kozaric,1995).

2.6. Determinação da Tensão Superficial

A tensão superficial da água do mar e dos cultivos livres de células foram determinadas pelo método do anel de *Du Noy* (ASTM D971, 1999) utilizando tensiômetro digital SIGMA 70 (KSV Instruments Ltd., Helsinki, Finland) na temperatura ambiente (25°C). A medida da tensão superficial (mN/m) foi realizada através do registro da força requerida para empurrar o anel de platina no líquido metabólico livre de células, através da interface ar-líquido (Singh e Cameotra, 2004).

2.7. Otimização Unirresposta - Abordagem MSR-GD

MSR é uma técnica de modelagem empírica utilizada para avaliar as relações entre um conjunto de fatores experimentais controláveis e os resultados observados. Envolve três passos básicos: (i) realização de planejamentos experimentais estatísticos; (ii) estimação de coeficientes para um modelo matemático utilizando como variáveis os fatores investigados; (iii) previsão de respostas e verificação da adequação do modelo matemático (Box e Behnken, 1960; Bhattacharya *et al.*, 2009). Isto geralmente implica no ajuste de um polinômio quadrático aos dados disponíveis por análise de regressão (Nagata e Chu, 2003). Este polinômio de segunda ordem é então usado para achar soluções ótimas, em geral, através de métodos baseados em GD, como o método de subida/descida da encosta pela trilha mais íngreme.

Nos processos de biodegradação de querosene e produção de biossurfactantes investigados no presente trabalho, modelos de segunda ordem para concentração de biomassa (y_1) e tensão superficial (y_2), foram desenvolvidos usando MSR associada a planejamento composto central, tendo como variáveis independentes o pH inicial (x_1) e as concentrações de sulfato de amônio (x_2) e fosfato monobásico de potássio (x_3). A forma geral dos modelos quadráticos desenvolvidos é dada pela seguinte equação:

$$y_k = a_0 + \sum_{i=1}^3 a_i x_i + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 a_{ij} x_i x_j \quad (k = 1,2) \quad (1)$$

onde, y é variável resposta prevista, a_0 é o intercepto, a_i e a_{ij} são os coeficientes da regressão do modelo de MSR, x_i e x_j são as variáveis independentes.

2.8. Otimização Unirresposta – Abordagem MSR-AG

AG são técnicas de pesquisa estocástica que imitam o processo de seleção natural (Holland, 1975; Goldberg, 1989). Eles têm a habilidade inerente de representar, de forma simples, estruturas altamente complicadas e de usar transformações simples para melhorar tais estruturas, visando alcançar uma solução ótima. Algoritmos genéticos convencionais normalmente possuem cinco componentes: uma representação cromossômica das soluções; uma função de avaliação imitando o papel do ambiente; um classificador de soluções em função de suas aptidões atuais; operadores genéticos que alteram a composição dos descendentes durante a reprodução e valores dos parâmetros algorítmicos (tamanho da população, probabilidades de aplicação de operadores genéticos etc.). AG convencionais normalmente usam codificação binária e são processados em quatro etapas: inicialização, seleção, cruzamento e mutação (Summanwar *et al.*, 2002). Uma característica atrativa dos AG em relação à MSR é não requerer continuidade ou diferenciabilidade da função objetivo (Nagata e Chu, 2003) para prever as condições ótimas.

2.9. Otimização multirresposta – Abordagens MSR-FD e MSR-FD-AG

A qualidade de um processo de biodegradação normalmente é descrita por diversas variáveis respostas e muitas vezes o que é ótimo para uma resposta pode não ser para outra. O uso de funções de desejabilidade permite a combinação de todas as informações contidas em variáveis respostas selecionadas em uma única medida D da qualidade do processo. Dependendo sobre se uma particular resposta y_i é para ser minimizada, maximizada ou associada a um valor alvo, as diferentes FD usadas são aquelas propostas por Deringer e Suich (1980).

Para melhoramento simultâneo dos processos de biodegradação de querosene (máxima concentração de biomassa) e de produção de biossurfactante (mínima tensão superficial) em água do mar por *C. lipolytica* UCP 0988 foi usada a otimização multirresposta por função de desejabilidade (Deringer, Suich, 1980). Seguindo a abordagem geral, as variáveis respostas concentração de biomassa (y_1) e a

tensão superficial (y_2) foram convertidas respectivamente, em funções de desejabilidade específicas, d_1 e d_2 , variando no intervalo $[0,1]$, onde se a resposta y_i ($i=1,2$) está em seu objetivo ou alvo, então $d_i = 1$, e se a resposta está fora de uma região aceitável, $d_i = 0$. Então, as variáveis dependentes pH (x_1) e concentrações de sulfato de amônio (x_2) e fosfato monobásico de potássio (x_3) foram selecionadas para maximizar a desejabilidade global D , definida como a média geométrica das desejabilidade individuais e cujo valor também varia no intervalo $[0,1]$.

Um valor de D diferente de zero indica que todas as respostas estão simultaneamente em um intervalo desejável. Quanto mais próximo de 1 for o valor de D , mais globalmente ótima será a combinação dos diferentes critérios e mais próximos estarão os valores respostas dos valores alvos.

A abordagem MSR-FD pode ser resumida nos seguintes passos: (i) realização de planejamento composto central e ajuste de modelos de segunda ordem para a concentração de biomassa e para a tensão superficial, (ii) definição das funções de desejabilidade parciais para a concentração de biomassa e para a tensão superficial e (iii) maximização da desejabilidade global em relação ao pH e as concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio. É importante ressaltar que nas funções de desejabilidade parciais os pesos são considerados unitários.

Em geral, AEMOS são projetados para achar uma bem distribuída aproximação da fronteira de Pareto, mas normalmente apenas uma pequena seção desta fronteira é de interesse prático (Mehnen e Trautmann, 2006). Na abordagem MSR-FD-AG proposta neste trabalho, planejamento composto central é empregado para obter medidas do critério de qualidade da produção de biomassa e da tensão superficial. A MSR é usada para construir as relações entre os fatores ou variáveis independentes do processo e os critérios de qualidade das variáveis resposta. O AG simples é usado para achar o objetivo otimizado simples, a FD é usada para avaliar a solução Pareto ótimo e a abordagem integrada MSR-FD-AG é usada para gerar soluções Pareto ótimo de interesse para o problema de OMR investigado.

A abordagem MSR-FD-AG proposta neste trabalho pode ser considerada como uma extensão evolutiva da abordagem MSR-FD. A diferença é que na etapa de maximização da desejabilidade global da abordagem MSR-FD, para cada resposta avaliada (produção de biomassa e tensão superficial), os níveis do pH e das concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio são

especificados (pelo usuário) como sendo iguais aos valores ótimos identificados pela abordagem MSR-AG. Desta forma, o conhecimento *a priori* obtido na abordagem MSR-AG sobre os dos níveis dos fatores de cada resposta é incorporado na abordagem MSR-FD, o que contribui para um tratamento mais eficiente de problemas multiobjectivos multimodais e para a obtenção de um conjunto de Pareto mais completo e diversificado. Os níveis dos fatores otimizados baseados sobre índices de desejabilidade são ótimos de Pareto. O índice de desejabilidade pode ser entendido como um método para seleção de uma solução Pareto-ótimo do conjunto Pareto-ótimo. De acordo com Mehnen e Trautmann (2006) funções de desejabilidade podem ser usadas para suportar uma busca evolucionária mais eficiente em problemas multiobjectivo com complexidade desbalanceada de objetivos simples.

2.10. Ambientes Técnico-Científicos de Desenvolvimento Integrado

As análises de regressão, de variância e de desejabilidade realizadas a partir de dados experimentais de planejamento composto central foram desenvolvidas usando o software Statistica® versão 8.0 (Statsoft. Inc, Tulsa/OK, USA). Os algoritmos genéticos foram desenvolvidos e executados usando o software Matlab® R2010a versão 7.10.0.499 (The Math WorkTM, USA).

3. Resultados e discussão

3.1. Otimização Unirresposta – Abordagem MSR-GD

3.1.1. Modelos para concentração de biomassa e tensão superficial

Os dados experimentais de concentração de biomassa e tensão superficial obtidos no planejamento central composto para biodegradação de querosene e produção de biossurfactantes por *Candida lipolytica* UCP 0988 estão apresentados na Tabela 2. As equações 2 e 3 apresentam, respectivamente, modelos de segunda ordem para concentração de biomassa (y_1) e tensão superficial (

y_2) obtidos a partir dos referidos dados. As variáveis independentes x_1 , x_2 e x_3 representam respectivamente o pH e as concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio.

$$y_1 = 17,39475 - 2,35068x_1 - 0,18975x_1^2 + 1,20905x_2 - 0,78754x_2^2 - 3,41976x_3 + 0,06762x_3^2 - 0,02931x_1x_2 + 0,14224x_1x_3 + 0,11857x_2x_3 \quad (2)$$

$$y_2 = 46,34691 - 0,82867x_1 + 0,04707x_1^2 - 1,15913x_2 + 0,21301x_2^2 + 0,67189x_3 + 0,03749x_3^2 + 0,50144x_1x_2 - 0,13937x_1x_3 - 0,25774x_2x_3 \quad (3)$$

A precisão do ajuste de um modelo é expressa pelo coeficiente de determinação R^2 . Quanto mais próximo de 1 for o valor de R^2 , melhor é a correlação entre os valores observados e previstos. O coeficiente de determinação ($R^2=0,8862$) do modelo para concentração de biomassa indica um bom grau de correlação entre os valores observados e os valores preditos, aproximadamente 89% da variabilidade da concentração da biomassa podem ser explicadas pelo modelo quadrático. Apesar da perda de biomassa devido à lavagem para extração do querosene residual e ao comportamento altamente não linear da mesma na região estudada, o modelo para concentração de biomassa apresentou um bom ajuste aos dados experimentais, ou seja, a falta de ajuste do modelo aos dados experimentais não foi estatisticamente significativa ($p=0,2899>0,05$). Por outro lado, o modelo para tensão superficial apresentou um alto coeficiente de correlação ($R^2=0,9569$), indicando não justificar menos que 5% da variabilidade da tensão superficial pelo modelo, que também não apresentou falta de ajuste aos dados experimentais estatisticamente significativos ($p=0,4398>0,05$). A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos experimentalmente e os valores previstos pelas Eqs. (2) e (3) para a concentração de biomassa e a tensão superficial.

3.1.2. Análise e identificação de condição ótima para produção de biomassa

Superfícies de resposta tridimensionais construídas usando a Eq. (2) são apresentadas na Fig.1, correspondendo aos efeitos combinados das concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio (Fig.1(a)); do pH inicial e da concentração de sulfato de amônio (Fig.1(b)) e do pH inicial e da concentração fosfato monobásico de potássio (Fig. 1(c)) sobre a concentração de biomassa. Como se pode observar, a concentração de fosfato monobásico de potássio, o pH e a interação do pH com o fosfato monobásico de potássio, nesta ordem são os fatores que mais favorecem o aumento da concentração de biomassa. Na Fig. 1(a) pode-se observar o efeito altamente significativo do pH alcalino sobre a concentração de biomassa. Independente da concentração de sulfato de amônio, o aumento do pH, favorece o aumento da concentração de biomassa. A Fig.1(b) ratifica a importância de pH extremamente alcalinos ou ácidos para o aumento da concentração de biomassa e conseqüentemente para o aumento da biodegradação de querosene em água do mar por *Candida lipolytica* UCP 0988: tanto associações de pH alcalinos e altas concentrações de nitrogênio quanto associações de pH ácidos e baixas concentrações de nitrogênio favorecem o aumento da concentração de biomassa. Nas condições estudadas, praticamente independente da concentração de sulfato de amônio, concentrações de fosfato monobásico de potássio mais elevadas ou reduzidas produzem um efeito positivo sobre o aumento da concentração de biomassa (Fig.1(c)). A localização do ponto crítico (ponto de sela) foi obtida pela diferenciação da Eq. (2) com relação ao pH e as concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio e resolvendo o conjunto de equações algébricas resultantes. A máxima concentração de biomassa prevista pelo modelo foi 9,46 g/L, para pH 10,80 e concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio, respectivamente iguais a 1,52 g/L e 12,60 g/L, e foi a princípio considerada como solução substituta ao ponto máximo local não encontrado. A máxima concentração de biomassa obtida experimentalmente usando o meio otimizado nas referidas condições foi $10,20 \pm 0,23$ g/L. Como o ponto crítico da superfície de resposta foi um ponto de sela, uma das soluções alternativas, discutida a

seguir, para obtenção das condições operacionais ótimas, foi a busca de ponto máximo global nos limites da região explorada usando AG.

3.1.3. Análise e identificação de condição ótima para produção de biossurfactante.

Superfícies de resposta tridimensionais construídas usando a Eq. (4) são apresentadas na Fig. 2, correspondendo aos efeitos combinados das concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio (Fig.2(a)); do pH inicial e da concentração de sulfato de amônio (Fig.2(b)) e do pH inicial e da concentração fosfato monobásico de potássio (Fig.2(c)) sobre a tensão superficial. Nas condições estudadas, o aumento do pH e as interações do pH com o fosfato monobásico de potássio e do sulfato de amônio com o fosfato monobásico de potássio, nesta ordem, favorecem a redução da tensão superficial. Na Fig. 2(a) pode ser observado que o aumento da concentração de fosfato monobásico de potássio e a redução da concentração de sulfato de amônio contribuem para a redução da tensão superficial dos meios para degradação de querosene e produção de biossurfactantes por *Candida lipolytica* UCP 0988 em água do mar. A importância da alcali-tolerância da levedura *Candida lipolytica* UCP 0988 para a produção de biossurfactante fica evidente nesta figura. A forte influência do pH alcalino e extremamente alcalino sobre a redução da tensão superficial pode ser observada nas Fig. 2(b) para baixas concentrações de sulfato de amônio e na Fig. 2(c) para concentrações elevadas de fosfato monobásico de potássio. A localização do ponto ótimo (ponto de sela) foi obtida pela diferenciação da Eq. (3) com relação ao pH e as concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio e resolvendo o conjunto de equações algébricas resultantes. A mínima tensão superficial prevista pelo modelo foi 45,47 mN/m para pH 2,91 e concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio, respectivamente iguais a 2,64 g/L e 5,53 g/L. A mínima tensão superficial obtida experimentalmente usando o meio otimizado foi $47,80 \pm 5,79$ mN/m. Os resultados obtidos neste caso mostram algumas das limitações da modelagem usando MSR. Como pode ser observado, o valor previsto para o pH é um valor externo a superfície experimental investigada no presente trabalho. Modelos baseados em MSR tendem a não realizar uma boa extrapolação dos dados. Isto indica que a solução

obtida usando MSR pode não convergir para soluções mais satisfatórias ou a solução ótima, o que ratifica o problema de baixa capacidade de modelagem devido ao uso de polinômios de segunda ordem. Para construir melhores modelos de superfícies de resposta para a tensão superficial sugere-se o uso de polinômios de ordem superiores ou modelos baseados em redes neurais artificiais, que não foi abordado neste trabalho devido às definições do escopo do trabalho e as restrições de tempo. Uma das soluções alternativas, discutida a seguir, para obtenção das condições operacionais ótimas, foi a busca usando AG de ponto mínimo global na região explorada.

3.2. Otimização Unirresposta - Abordagem MSR-AG

AG exploram todas as regiões do espaço de soluções usando uma população de indivíduos ou cromossomos. No presente trabalho, cada cromossomo ou indivíduo representa uma solução ou vetor tridimensional ($x = [x_1, x_2, x_3]$) formado pelas variáveis independentes -pH e concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio - dos modelos quadráticos baseados em MSR. Os modelos de segunda ordem obtidos usando MSR foram usados como funções objetivos, visando maximizar a concentração de biomassa (y_1) e minimizar tensão superficial (y_2). As buscas pelas condições operacionais ótimas (pH e concentrações de sulfato de amônio e fosfato de potássio) para maximização da concentração de biomassa e para minimização da tensão superficial foram restritas aos intervalos das variáveis especificados na Tabela 1. A Tabela 3 apresenta os valores dos parâmetros específicos dos AG (comprimento do cromossomo, tamanho da população, probabilidade de cruzamento, probabilidade de mutação e número de gerações) usados para maximizar a concentração de biomassa e para minimizar a tensão superficial. Cada variável independente ou gene foi representado por um número binário de 20 bits, tamanho suficiente para obter a precisão desejada, sem comprometer os recursos computacionais disponíveis e considerando um tempo de processamento satisfatório. Conseqüentemente, cada cromossomo foi representado por 60 bits. Testes com populações iniciais de diferentes tamanhos foram realizados, considerando tanto a diversidade populacional quanto a convergência e o tempo de

processamento do AG. O tamanho 200 foi selecionado como ideal para o problema investigado. Então, uma população inicial de 200 indivíduos foi gerada aleatoriamente a partir da função objetivo, de modo a cobrir uniformemente todo o espaço de busca. Cada indivíduo foi avaliado usando a função objetivo como função de aptidão. Após a avaliação da aptidão dos indivíduos da população e seleção inicial aleatória dos pais, as populações intermediárias foram geradas por torneio estocástico, de tamanho 4, com reposição; operações genéticas de cruzamento em dois pontos e mutação foram aplicadas aos indivíduos selecionados de acordo com sua aptidão para produzir uma nova geração de indivíduos. Este processo foi repetido até o critério de parada (500 gerações ou convergência para solução) ser obtido.

3.2.1. Otimização da concentração de biomassa

Para avaliação do grau de aptidão de um cromossomo ou indivíduo da população, o cromossomo ou vetor tridimensional $x = [x_1, x_2, x_3]$ foi aplicado à função objetivo (Eq.2) com sinal negativo por tratar-se de um problema de maximização e a saída da função foi avaliada. Portanto, o grau de aptidão foi avaliado usando a seguinte equação:

$$f_i^{apt} = -y_i^{pred}, i = 1, 2, \dots, N_{pop} \quad (4)$$

Onde f_i^{apt} denota o grau de aptidão da i -ésima solução candidata e y_i^{pred} refere-se a concentração de biomassa predita pela função objetivo (Eq.2) quando a i -ésima solução é usada como entrada.

As três melhores condições operacionais (pH e concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio) para maximização da concentração de biomassa obtidas após diversas explorações do espaço das soluções, usando diferentes populações iniciais selecionadas aleatoriamente, estão apresentadas na Tabela 4. A evolução da melhor concentração de biomassa sobre 500 gerações do AG e as magnitudes do pH e das concentrações de sulfato de amônio e fosfato de potássio para a melhor concentração de biomassa, estão representadas na Fig.3. Como pode ser observado na Fig.3(a), a

concentração de biomassa aumenta continuamente até a 20^a geração na qual atinge o valor de aproximadamente 23,51 g/L e então permanece praticamente constante, ou seja, com mudança média no valor de aptidão inferior a 10^{-6} .

As três soluções supracitadas foram validadas experimentalmente e apresentaram valores de concentrações de biomassa próximos aos previstos pelo AG, conforme pode ser verificado na Tabela 4. Os resultados experimentais mostraram altos valores para concentração de biomassa. A média das três concentrações de biomassa obtidas experimentalmente usando as três melhores condições previstas pelo AG foi igual a $22,45 \pm 0,97$ g/L. A aplicação de teste *t* de *student* ($t = 1,877187$) para amostras pareadas mostrou que não existe diferença significativa ($p = 0,201293$) entre o resultado experimental da validação e o resultado previsto pelo AG para a concentração máxima de biomassa na região estudada.

Por outro lado, houve um aumento de 120,10% na concentração de biomassa obtida experimentalmente usando as condições identificadas pelo AG em relação ao valor experimental da concentração de biomassa obtido nas condições ótimas previstas por MSR. Os resultados obtidos ressaltam a diferença entre métodos de otimização local baseado em gradiente como MSR (estimação por derivação) e métodos de otimização global como AG, que são especialmente atrativos para problemas que usualmente exibem muitos ótimos locais. Compatibilizando-se os parâmetros ao esforço computacional, a otimização baseada em AG mostrou ser uma alternativa viável para otimização baseada em MSR.

3.2.2. Otimização da tensão superficial

Para avaliação do grau de aptidão de um cromossomo ou indivíduo da população, o cromossomo ou vetor tridimensional $x = [x_1, x_2, x_3]$ foi aplicado à função objetivo (Eq.3) e a saída da função foi avaliada. Ou seja, o grau de aptidão foi avaliado usando a seguinte equação:

$$f_i^{apt} = y_i^{pred} \quad i = 1, 2, \dots, N_{pop} \quad (5)$$

Onde f_i^{apt} denota o grau de aptidão da i -ésima solução candidata e y_i^{pred} refere-se à concentração de biomassa predita pela função objetivo quando a i -ésima solução é usada como entrada e N_{pop} é o tamanho da população.

As três melhores condições operacionais (pH e concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio) para minimização da tensão superficial - obtidas após diversas explorações do espaço das soluções, usando diferentes populações iniciais selecionadas aleatoriamente, estão apresentadas na Tabela 5. A evolução da melhor tensão superficial sobre 500 gerações do AG e as magnitudes do pH e das concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio para a melhor tensão superficial, estão representadas na Fig. 4. Como pode ser observado na Fig. 4(a), a tensão superficial diminui continuamente até 25^a geração na qual atinge o valor de aproximadamente 33,93 mN/m e então permanece praticamente constante, ou seja, com mudança média no valor de aptidão inferior a 10^{-6} .

As três soluções foram validadas experimentalmente e apresentaram valores de tensão superficial mínima próximos aos previstos pelo AG, conforme pode ser verificado na Tabela 5. A média destes três valores de tensão superficial mínima obtidos experimentalmente usando as três condições previstas pelo AG foi igual a $34,31 \pm 0,73$ mN/m. A aplicação de teste t de *student* ($t = -0,894960$) mostra que não existe diferença significativa ($p = 0,465250$) entre este resultado experimental e o resultado previsto pelo AG para a tensão superficial mínima. A comparação do valor médio experimental da tensão superficial obtidos nas condições ótimas previstas por AG com o valor médio da tensão superficial obtido nas condições ótimas previstas por MSR mostra que nas condições identificadas pelo AG houve uma redução de aproximadamente 28,22% na tensão superficial. Esta habilidade dos métodos computacionais evolucionários, como AG, em localizar máximos e mínimos globais em grandes espaços de busca, torna os mesmos uma ferramenta extremamente poderosa e prática para otimização/melhoramento de parâmetros e variáveis chaves em processos biotecnológicos.

A diferença entre os resultados obtidos mostra que a abordagem MSR-AG apresentou melhor desempenho na localização do ponto ótimo global que a abordagem MSR-GD convencional; tanto no

problema de maximização da concentração de biomassa quanto no problema de minimização da tensão superficial no processo de biodegradação de querosene. Em casos de funções não lineares multimodais com vários mínimos locais, AG exploram mais eficientemente as superfícies de respostas.

3.3. Otimização multirresposta – Abordagens MSR-FD e MSR-AG-FD

Os resultados da OUR e da OMR usando as abordagens MSR-FD e MSR-AG-FD para maximização da produção de biomassa e minimização da tensão superficial, encontram-se sintetizados na Tabela 6. Experimentos foram realizados, em triplicatas, nas condições obtidas pela OUR e pela OMR. Em todos os casos, o desvio padrão médio e desvio padrão percentual foram calculados para validar os experimentos os resultados mostram que os valores experimentais apresentaram boa concordância com os valores previstos.

Em processos de biodegradação de hidrocarbonetos, o pH e as concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio encontram-se entre os fatores que exercem efeitos estatisticamente significativos sobre a produção de biomassa e a tensão superficial. Os critérios de qualidade considerados neste trabalho para biodegradação de querosene em água do mar foram máxima produção de biomassa e mínima tensão superficial (máxima produção de biossurfactantes). Estes dois critérios de qualidade das saídas resultam em um problema de otimização multiobjectivo com objetivos conflitantes.

Sendo os objetivos conflitantes, o problema pode apresentar soluções múltiplas, cada uma correspondendo a um compromisso ótimo entre estes objetivos. Como não se tinha *a priori* conhecimento sobre a solução mais adequada (condição ambiental que resultasse em máxima produção e mínima tensão superficial) a busca foi direcionada para encontrar este tipo de solução, em quantidade suficiente para uma tomada de decisão rápida e eficaz. Portanto, foi necessário localizar um conjunto de soluções de Pareto (não dominadas) para a tomada de decisão *a posteriori* sobre as condições ótimas no processo de biodegradação.

Neste trabalho, as respostas obtidas para produção de biomassa e tensão superficial com os correspondentes índices de desejabilidades global (D) foram usados para avaliar a eficácia da otimização multirresposta. Os perfis para os valores previstos e desejabilidade encontram-se ilustrados nas Figuras 5(a), 5(b), 6(a), 6(b) para fatores definidos, respectivamente: nos valores médios identificados pelas FD ($MSR-FD^a$), nos valores ótimos identificados pelas FD (MSR_FD^b), nos valores ótimos identificados pelo AG para a biomassa ($MSR-FD-AG^c$) e (d) nos valores ótimos identificados por AG para a tensão superficial ($MSR-FD-AG^d$).

As comparações dos D das abordagens $MSR-FD^a$, $MSR-FD^b$, $MSR-FD-AG^c$ e $MSR-FD-AG^d$ mostram que: (i) as abordagens $MSR-FD^b$ e $MSR-FD-AG^c$ atingiram o D máximo; (ii) a abordagem $MSR-FD-AG^c$ permitiu uma sintonia fina da solução apresentada pela abordagem $MSR-FD^b$, com relação a concentração de sulfato de amônio (iii) as abordagens $MSR-FD^b$ e $MSR-FD-AG^c$ apresentaram valores do D 44% maior que o da abordagem $MSR-FD-AG^d$ e 50% maior que $MSR-FD-AG^a$.

A grande diferença entre as respostas obtidas pelas abordagens $MSR-FD-AG^c$ e $MSR-FD^a$ sugere a existência de uma condição sub-ótima local no ponto central do planejamento e ratifica a eficácia da abordagem $MSR-FD-AG^c$ para identificar condição global ótima ou próxima da ótima. Por outro lado, a pequena mais significativa diferença entre as respostas obtidas pelas abordagens $MSR-FD-AG^c$ e $MSR-FD^b$ indica que solução identificada pela abordagem $MSR-FD-AG^c$ domina a solução identificada pela abordagem $MSR-FD-AG^a$ (Figura 7) e conseqüentemente a abordagem $MSR-FD-AG^c$ pode ser considerada como uma ferramenta alternativa eficiente e confiável para otimização multirresposta do processo de biodegradação de querosene por *C.lipolytica* UCP0988 em água do mar e de outros bioprocessos, que envolvam funções objetivos conflitantes e multimodais.

As comparações dos valores experimentais da produção de biomassa e da tensão superficial mostram que nas condições identificadas pela abordagem $MSR-FD-AG^c$ houve: um aumento de 143,48% na produção de biomassa e uma redução de aproximadamente 16,63% na tensão superficial em relação aos valores obtidos pela abordagem $MSR-FD^a$; (ii) um aumento de 109,35% na produção de biomassa e um aumento de aproximadamente 4,21% na tensão superficial em relação aos valores obtidos pela

abordagem MSR-FD^d; (iii) um aumento de 0,9% na produção de biomassa e uma redução de aproximadamente 1,85% na tensão superficial em relação aos valores obtidos pela abordagem MSR-FD^b.

De um modo geral, as abordagens MSR-FD^b e MSR-FD-AG^{c,d} mostraram ser adequadas para o problema de OMR de funções multimodais, envolvendo a busca do melhor compromisso entre maximização de concentração de biomassa e minimização de tensão superficial. Entretanto, a abordagem MSR-FD-AG^c mostrou ser mais precisa que a MSR-FD^b, na localização de máximos e mínimos globais próximos a pontos de sela no espaço de busca da função objetivo, para funções altamente não lineares, descontínuas e multimodais. Introduzida neste trabalho como uma extensão da abordagem MSR-FD, a abordagem MSR-FD-AG permite ampliar e diversificar, de forma simples, rápida e eficiente, o conjunto de parâmetros que satisfazem os requisitos de qualidade de cada resposta investigada. A análise de viabilidade deste conjunto ampliado e diversificado de soluções ótimas de Pareto, realizada *a posteriori*, baseando-se no D e em diferentes pontos de vista práticos (técnico-científico, sócio-econômico e ambiental), permite prevenir a tomada de decisão prematura por uma das soluções, evitando desperdício de tempo e recursos. A obtenção de soluções múltiplas e diversas requer a análise de viabilidade das mesmas, mas não obriga a escolha de uma única melhor solução, especialmente quando os resultados são conflitantes.

4. Discussão

Os trabalhos pioneiros realizados por Atlas e Bartha (1973) e Atlas (1995), mostrando que as concentrações de nitrogênio e fósforo em água do mar são fatores limitantes para crescimento de microorganismos degradadores de hidrocarbonetos, têm sido ratificados ao longo dos anos (Leahy e Colwell, 1990; Kirkpatrick *et al.*, 2006; Adesodun e Mbagwu, 2008; Nikolopoulos e Kalogerakis, 2008; Zahed *et al.*, 2010c). Entretanto, pesquisas sobre desenvolvimento de meios de cultivo e otimização de condições ambientais para degradação microbiana de querosene ainda são escassas na literatura (Shabir *et al.*, 2008; Gouda *et al.*, 2007; Wongsu *et al.*, 2004; Nocentini *et al.*, 1997, 1998). Embora, a identificação de condições ótimas de pH e de fontes de nitrogênio e fósforo para degradação de hidrocarbonetos e

produção de bioemulsificantes e/ou biossurfactantes em água do mar natural ou artificial ou diluída também venha sendo investigada há anos (Atlas,1995; Zinjarde *et al.*, 1997; Vance-Harrop *et al.*, 2003, Albuquerque *et al.*, 2006, Souza *et al.*, 2012), este é o primeiro trabalho a propor a aplicação de abordagens híbridas associando MSR, FD e AG para resolver problema de OMR com objetivos conflitantes em processo de biodegradação de querosene em água do mar por *C.lipolytica* UCP0988.

Neste trabalho, as abordagens MSR-FD e MSR-FD-AG foram aplicadas com sucesso na identificação de condições ambientais - representando o melhor compromisso entre a maximização da produção de biomassa e minimização da tensão superficial. Nas referidas condições identificadas pelas abordagens MSR-FD-AG^d, MSR-FD^c, MSR-FD-AG^b (Tabela 6), os valores das relações N/P e das tensões superficiais obtidas foram respectivamente iguais a 0,018 e 33,93 mN/m; 0,096 e 35,58 mN/ e 0,11 e 35,87 mN/m, reforçando observações de trabalhos anteriores (Kitamoto *et al.*, 1992; Albrecht *et al.*, 1996; Amaral *et al.*, 2010; Fontes *et al.*, 2010) que sugerem que a síntese de biossurfactante acontece em condições de limitação de nitrogênio. Por outro lado, Gouda e colaboradores (2007) estudaram os efeitos de diferentes relações N/P sobre a degradação de querosene, por três diferentes micro-organismos (*Pseudomonas* sp. AP, *Pseudomonas* sp. CK e *Gordonia* sp.DM), usando uréia como fonte de nitrogênio e superfosfato como fonte de fósforo e não observaram efeitos significativos, decorrentes das variações das relações N/P sobre a biodegradação de querosene (2% v/v). O uso de diferentes fontes de nitrogênio também foi analisado e mostrou que o sulfato de amônio teve efeito inibitório sobre os três micro-organismos investigados. Outros estudos relatam que o nitrogênio exerce um efeito mais significativo que fósforo na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo (Huang et al, 2008).

A análise das condições que apresentaram o melhor compromisso entre produção de biomassa e redução de tensão superficial obtidas através das diferentes abordagens da OMR (Figura 7, Tabela 6), permite observar que o aumento do pH favoreceu o aumento da produção de biomassa e que em pH extremamente alcalino, a redução da fonte de nitrogênio favoreceu a redução da tensão superficial. Estes resultados estão de acordo com a análise das condições otimizadas pela OUR, segundo a qual o aumento do pH, a interação do pH com o fosfato de potássio e a interação do sulfato de amônio com o fosfato monobásico de potássio favoreceram a redução da tensão superficial, enquanto o aumento da

concentração de fosfato de potássio, o aumento do pH e a interação do pH com o fosfato monobásico de potássio favoreceram o aumento da produção de biomassa.

De acordo com a literatura, biossurfactantes podem emulsificar hidrocarbonetos, diminuir as tensões superficiais e interfaciais, aumentar a solubilidade dos hidrocarbonetos em água e conseqüentemente as taxas de biodegradação e biodisponibilidade dos hidrocarbonetos poluentes (Banat, 1995ab; Banat *et al.*, 2000; Miller, 1996; Thiem, 1994; Guha e Jaffe, 1996; Hua *et al.*, 2003). Zinjarde e Pant (2002) estudaram a produção de emulsificantes por *Y. lipolytica* NCIM 3589 na presença de alcanos ou petróleo bruto e observaram, na fase estacionária, produção extracelular de emulsificantes, sob condições de excesso de carbono e limitação de nitrogênio. Outros requisitos para produção extracelular de bioemulsificante foram pH inicial 8 e concentração de cloreto de sódio de 2 a 3%. Lovaglio *et al* (2011) relatam terem encontrado a mais alta atividade de emulsificação de ramnolípídeos de *P.aureginosa* LB com querosene, em pH variando de 5 a 9, indicando que o biossurfactante produzido por *P.aureginosa* LBI pode ser usado sob condições de pH extremo em processos de biorremediação ambiental.

Neste trabalho, o pH extremamente alcalino não inibiu o crescimento de *C.lipolytica* UCP 0988 e a biodegradação de querosene em água do mar, suplementada com sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio, possivelmente porque sob condições altamente estressantes, a levedura deve ter produzido biossurfactantes e enzimas capazes de quebrar e aumentar a biodisponibilidade das cadeias de hidrocarbonetos do querosene, única fonte de carbono microbiana. Através de sua atividade metabólica, *C. lipolytica* UCP 0988 deve ter produzido, metabolitos ácidos extracelulares que reduziram o pH do meio externo. Portanto, pode-se supor que o pH interno da célula deve ter permanecido perto do neutro, mesmo com o pH do meio externo extremamente alcalino. Estes resultados reforçam trabalho pioneiro desenvolvido por Zvyagilskaya e Persson (2004), de acordo com o qual as leveduras são dotadas de um sistema de aquisição de fosfato inorgânico (Pi), dependente de íon de sódio (Na⁺), com alta capacidade, alta afinidade e finamente controlado. No referido trabalho, os autores mostram as vantagens de uma variedade de levedura *Yarrowia lipolytica*, osmo-halo-álcali tolerante, como um modelo de organismo

promissor para estudo de Pi sobre grandes flutuações nos valores de pH do meio de crescimento e especialmente em valores de pH alcalinos.

Nas diferentes condições identificadas pelas OUR e pela OMR (Tabela 6), a levedura *Candida lipolytica* UCP 0988 foi capaz de metabolizar querosene e produzir biossurfactantes em água do mar extremamente alcalina suplementada com sais de nitrogênio e fósforo, apresentando características de osmo-álcali tolerância que sugerem seu uso na biorremediação de ambientes marinhos e lacustres contaminados com petróleo e derivados e na produção de bioprodutos de alto valor agregado (biossurfactantes, bioemulsificantes e enzimas).

5. Conclusões

A levedura *Candida lipolytica* UCP 0988 é capaz de utilizar querosene e produzir biossurfactantes em água do mar em condições extremas de alcalinidade quando adequadamente suplementada com fontes de nitrogênio e fósforo. As abordagens híbridas baseadas na associação de MSR, FD e AG são alternativas viáveis a abordagem convencional, baseada em MSR e GD - para identificar condições operacionais (pH e concentrações de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio) que representem o melhor compromisso entre biodegradação de querosene (maximização de biomassa) e produção de biossurfactante (minimização de tensão superficial) em água do mar por *Candida lipolytica* UCP 0988. Abordagens similares, baseadas em MSR, FD e AG, podem ser usadas para modelagem e otimização de outros processos biotecnológicos e de biorremediação ambiental.

Agradecimentos

À Universidade Católica de Pernambuco, à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro dado a esta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Agary, S.E., Owabor C.N., Yusuf R.O. (2012). Enhanced Bioremediation of Soil Artificially Contaminated with Kerosene: Optimization of Biostimulation Agents through Statistical Experimental Design. *J. Pet. Environ. Biotechnol.*, 3:3:1-8.
- Albrecht, A., Rau, U., Wagner, F., 1996. Initial steps of sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* ATCC 22214 grown on glucose. *Appl Microbiol Biotechnol* 46, 67-73.
- Albuquerque, C.D.C., Fileti A.M.F., Campos-Takaki G.M., 2006. Optimizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. *Can. J. Microbiol.* 52, 575-583.
- Amaral, P.F.F.; Coelho, MAZ; Marrucho, IM; Coutinho, JAP, 2010. Biosurfactants from Yeasts: Characteristics, Production and Application. Chapter 18 In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 672, 236-249. Edited by Ramkrishna. Sen Landes Bioscience.
- Atlas, R.M., 1995. Bioremediation of Petroleum Pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 317-327.
- Atlas, R.M., Bartha, R., 1973. Stimulated biodegradation of oil slicks using oleophilic fertilizers. *Environ SciTechnol* 7, 538–541.
- Banat, I.M., 1995a. Biosurfactants production and use in microbial enhanced oil recovery and pollution remediation: a review. *Biores. Technol.* 51, 1–12.
- Banat, I.M., 1995b. Characterization of Biosurfactants and their use in pollution removal; state of the art, a review. *ATCA Biotechnol.* 15, 251–267.
- Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S., 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol.* 53, 495–508.
- Bhattachayra, S.S., Karmakar, S., Banerjee, R., 2009. Optimization of laccase mediated biodegradation of 2,4-dichlorophenol using genetic algorithm. *Wat. Res.* 43, 3503 - 3510.

- Box, G.E.P., Behnken, D.W., 1960. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics* 2, 455–475.
- Derringer, G., Suich, R., 1980. Simultaneous optimization of several response variables. *J.Q.Technol.* 12, 214-219.
- Desai, K. M., Akolkar, S. K., Badhe, Y. P., Tambe, S. S. and Lele, S. S., 2006. Optimization of fermentation media for exopolysaccharide production from *Lactobacillus plantarum* using artificial intelligence based techniques. *Process Biochemistry*, 41, 1842-1848.
- Fontes, GC, Amaral, PFF; Nele, M.; Coelho, MAS (2010) Factorial Design to Optimize Biosurfactant Production by *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* p.1-8.
- Gaitonde, V.N.; Karnik, S.R.; Achyuta, B.T.; Sideswarappa, B., 2008. Genetic algorithm-based burr size minimization in drilling of AISI 136L stainless steel. *J.Mater. Process. Technol.* 197, 225-236.
- Goldberg, D.E., 1989. Genetic algorithms in search, optimization and machine learning. Addison-Wesley Longman Publishing Company Inc., New York.
- Gouda, M.K., Omar, S.H., Chekroud, Z.A., Eldin, H.M.N., 2007. Bioremediation of kerosene I: A case study in liquid media. *Chemosphere*, 69, 1807–1814.
- Guha, S., Jaffe, P., 1996. Biodegradation kinetics of phenanthrene partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. *Environ Sci Technol.* 30, 605–611.
- Holland, J. H., 1992. *Adaptation in Natural and Artificial Systems*. Cambridge, MA:MIT Press. Second edition (First edition, University of Michigan Press, 1975).
- Hua, Z., Chen, J., Lun, S., Wang, X., 2003. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. *Wat. Res.* 37, 4143–4150.
- Huang, L., Ma, T., Li, D., Liang, F.-I., Liu, R.-L., Li, G.-q., 2008 Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis*. *Mar. Pol. Bull.* 56, 1714-1718.

- Kiran, G.S., Thomas, T.A., Selvin, J., Sabarathnam, B., Lipton, A.P., 2010. Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. *Biores. Technol.*, 101, 2389–2396.
- Kirkpatrick, W.D., White Jr., P.M., Wolf, D.C., Thoma, G.J., Reynolds, C.M., 2006. Selecting plants and nitrogen rates to vegetate crude-oil-contaminated soil. *Int. J. Phytorem.* 8, 285–297.
- Kitamoto, D., Fuzishiro, T., Yanagishita H., 1992. Production of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by resting cells of *Candida antarctica*. *Biotechnol. Lett.* 14, 305-310.
- Lovaglio, R.B., Santos, F.J. ; Jafelicci Junior, M., Contiero, M.J. (2011) Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 85 301–305.
- Luna, J.M., Rufino, R.D., Albuquerque, C.D.C., Sarubbo, L.A., Campos-Takaki, G.G., 2011. Economic Optimized Medium for Tensio-Active Agent Production by *Candida sphaerica* UCP 0995 and Application in the Removal of Hydrophobic Contaminant from Sand. *Int. J. Mol. Sci.*, 12, 2463-2476.
- Mehnen, J. and Trautmann, H. (2006): Integration of Expert's Preferences in Pareto Optimization by Desirability Function Techniques; In: Proceedings of the 5th CIRP International Seminar on Intelligent Computation in Manufacturing Engineering (CIRP ICME '06), Ischia, Italy, R. Teti (ed.), pp. 293-298
- Miller, R.M., 1996. Surfactant-enhanced bioavailability of slightly soluble organic compound. In: Skipper HD, Turco RF, editors. *Bioremediation: science and applications*. Madison, WI: Soil Sci. Soc. Am; p. 33–54.
- Mohajeri, L., Aziz, H.A., Isa, M.H., Zahed, M.A., 2010. A statistical experiment design approach for optimizing biodegradation of weathered crude oil in coastal sediments. *Biores. Technol.* 101, 893–900.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C., 2009. *Response surface methodology: process and products optimization using designed experiments*. (Wileys Series in Probability and Statistic), Willey, New York.
- Nagata, Y., Chu, K.H., 2003. Optimization of a fermentation medium using neural networks and genetic algorithms. *Biotechnol. Letters.* 25, 1837-1842.
- Nikolopoulou, M., Kalogerakis, N., 2008. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers combined with biosurfactants and molasses. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 1855–1861.

- Nocentini, M., Penilli, D., Pasquali, G., Fava, F., Prandi, A., 1997. Biotreatability and feasibility studies for a bioremediation process of a kerosene contaminated soil. In: Verachtert, H., Verstraete, W. (Eds.), Proceedings of International Symposium on Environmental Biotechnology, vol. 2. Technologisch Institut, Antwerpen, Belgium, pp. 307–310.
- Nocentini, M., Penilli, D., Pasquali, G., Fava, F., Prandi, A., 1998. Biotreatability and feasibility tests for a bioremediation process: a case study for a kerosene contaminated soil. Ann. Chim.-Rome 88, 177–187.
- Pal, M.P., Vaidya, B.K., Desai, K.M., Joshi, R.M., Nene, S.N., Kulkarni, V.D., 2009. Media optimization for biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* MTCC 2794: artificial intelligence versus a statistical approach. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36, 747–756.
- Rufino, R.D., Sarubbo, L.A., Benicio, B.N., Campos-Takaki, G.M., 2008, Experimental design for the production of tensio-active agent by *Candida lipolytica*, J. Industrial Microbiol. Biotechnol., 35, 907-914.
- Shabir, G., Afzal, M., Anwar, F., Tahseen, R., Khalid, Z.M., 2008. Biodegradation of kerosene in soil by a mixed bacterial culture under different nutrient conditions. International Biodet. Biodegrad. 61, 161–166.
- Silva, J.F., 2012. Biodegradação de querosene por *Candida lipolytica* UCP 0988 em água do mar. Dissertação (MDPA). Universidade Católica de Pernambuco. 115p.
- Singh, P., Cameotra, S.S., 2004. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. Trends in Biotechnology. v.22, 3, p.142–146
- Sivapathasekaran, C., Mukherjee, S., Ray, A., Gupta, A., Sen, R., 2010. Artificial neural network modeling and genetic algorithm based medium optimization for the improved production of marine biosurfactant. Biores.Technol. 101, 2884–2887.
- Souza, F.A.S.D., Salgueiro, A.S., Albuquerque, C.D.C., 2012. Production of bioemulsifiers by *Yarrowia lipolytica* in sea water using diesel oil as the carbon source. Braz. J. Chem. Eng. 29, 61-67.
- Su, C-H., Hou, T-H, 2008 Using multipopulation intelligent genetic algorithm to find the pareto-optimal parameters for a nano-particle milling process. Expert.Syst. Appl. 34, 2502-2510.

- Summanwar, V.S., Jayaraman, V.K., Kulkarnir, B.D., Kusumakar, H.S., Rajesh, J., 2002. Solution of constrained optimization problems by multi-objective genetic algorithm. *Comp. Chem. Eng.*, 26, 1481-1492.
- Treier, K., Lester, P., Hubbuch, J., 2012. Application of genetic algorithms and response surface analysis for the optimization of batch chromatographic systems. *Biochem. Eng. J.*, 63, 66-75.
- Thiem, A., 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 258–263.
- Vance-Harrop, M. H., Buarque-Gusmão, N., Campos-Takaki, G.M., 2003. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using d-glucose and babassu oil as carbon sources. *Braz. J. Microbiol.*, 34, 120-123.
- Wongsa, P., Tanka, M., Ueno, A., Hasanuzzaman, M., Yumoto, I., Okuyama, H., 2004. Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. *Curr. Microbiol.* 49, 415–422.
- Wu, S., Yu, X., Hu, Z., Zhang, L., Chen, J., 2009. Optimizing aerobic biodegradation of dichloromethane using response surface methodology. *J. Environ. Sci.* 21, 1276–1283.
- Zahed, M.A., Aziz, H.A., Isa, M.H., Mohajeri, L., Mohajeri, S., 2010c. Optimal conditions for bioremediation of oily seawater. *Bioresource Technol.* 101, 9455-9460.
- Zahed, M.A., Aziz, H.A., Isa, M.H., Mohajeri, L., 2010a. Effect of Initial Oil Concentration and Dispersant on Crude Oil Biodegradation in Contaminated Seawater. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 84, 438-442.
- Zahed, M.A., Aziz, H.A., Isa, M.H., Mohajeri, L., 2010b. Enhancement biodegradation of n-alkanes from crude Oil Contaminated Seawater. *Int. J. Environ. Res.*, 4, 655-664.
- Zafar, M., Kumar, S., Kumar, S., 2010. Optimization of naphthalene biodegradation by a genetic algorithm based response Surface methodology. *Braz. J. Chem. Eng.*, 27, 89-99.
- Zhou, Q.-H., Kosaric, N., 1995. Utilization of canola oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola*, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72, 67–71.

Zinjarde, S., Chinnathambi, S., Lachke, A. H., Pant, A., 1997. Isolation of an emulsifier from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 using a modified mini isoelectric focusing unit. Lett. Appl. Microbiol. 24, 117–121.

Zinjarde SS, Pant A. 2002 Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. J Basic Microbiol; 42:67-73.

Zitzler, E., Thiele, L., 1999. Multiobjective evolutionary algorithms: a comparative case study and the strength Pareto approach. IEEE Trans.Evolut. Comput. 3, 257-271.

Zvyagilskaya, R.A., Persson, B.L. (2004) A new alkalitolerant *Yarrowia lipolytica* yeast strain is a promising model for dissecting properties and regulation of Na⁺-dependent phosphate transport systems. Biochemistry (Moscow), v.69, n.11, p1310-1317.

Tabela 1. Níveis e valores dos fatores do planejamento composto central

Fator	Nível				
	-1,68	-1	0	+1	1,68
pH	4,03	6,00	8,90	11,80	13,77
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	0,32	1,00	2,00	3,00	3,68
KH ₂ PO ₄ (g/L)	1,24	6,00	13,00	20,00	24,76

Tabela 2. Matriz codificada das variáveis independentes do planejamento central composto e valores observados experimentalmente e previstos por MSR para a concentração de biomassa e a tensão superficial (TS)

Ensaio	pH	Sulfato	Fosfato	Biomassa	Biomassa	TS	TS
				Observada (g/L)	Prevista (g/L)	Observada (mN/m)	Prevista (mN/m)
1	-1	-1	-1	13,40	12,66	42,90	43,95
2	+1	-1	-1	9,40	11,49	41,77	42,06
3	-1	+1	-1	6,89	9,85	47,00	46,26
4	+1	+1	-1	7,84	8,33	49,20	50,19
5	-1	-1	+1	3,30	3,01	52,63	51,69
6	+1	-1	+1	16,14	13,38	37,70	38,48
7	-1	+1	+1	5,40	3,52	47,03	46,78
8	+1	+1	+1	12,61	13,55	40,40	39,39
9	-1,68	0	0	0,25	0,32	46,87	47,42
10	+1,68	0	0	8,12	7,76	40,23	39,63
11	0	-1,68	0	6,32	7,43	42,33	41,65
12	0	+1,68	0	6,61	5,21	43,73	44,36
13	0	0	-1,68	22,52	19,76	49,80	48,87
14	0	0	+1,68	13,56	16,03	45,43	46,30
15	0	0	0	7,68	8,54	41,53	42,40
16	0	0	0	10,57	8,54	43,57	42,40
17	0	0	0	7,33	8,54	42,10	42,40

Tabela 3. Parâmetros específicos usados nas otimizações baseadas em AG

Parâmetro Específico	Maximização da Concentração de Biomassa	Mininização da Tensão Superficial
l_{ch} (comprimento do cromossomo)	60	60
N_{pop} (tamanho da população)	200	200
P_{cr} (probabilidade de cruzamento)	0,80	0,80
P_{mut} (probabilidade de mutação)	0,05	0,05
N_g^{\max} (número de gerações)	500	500

Tabela 4. Concentrações de biomassa previstas e validadas experimentalmente em condições operacionais ótimas determinadas usando abordagem híbrida MSR- AG

Solução Otimizada por AG	Número de Gerações	pH	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	BIO prevista por AG-MSR (g/L)	BIO Experimental (g/L)
1	262	13,7697	2,3654	24,7600	23,50529	21,98682
2	158	13,7698	2,3660	24,7600	23,50526	21,80000
3	82	13,7695	2,3821	24,7599	23,50492	23,56864
*	Média	13,7697	2,3712	24,7600	23,50516	22,45182
*	DP	0,00015	0,00947	5,7735E-05	0,000206	0,971695
*	CV	0,00111	0,39952	0,0002	0,000874	4,327911

BIO- Concentração de Biomassa DP-Desvio Padrão CV -Coeficiente de Variação

Tabela 5. Condições de meios para degradação de querosene e produção de biossurfactantes por *Candida lipolytica* UCP 0988 otimizadas para mínima tensão superficial (TS) usando abordagem híbrida RMS- AG.

Solução Otimizada por AG	Número de Gerações	pH	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	TS Prevista por AG-MSR (mN/m)	TS Experimental (mN/m)
1	354	13,7700	0,3201	17,7834	33,93116	33,80
2	44	13,7698	0,3200	17,7157	33,93134	33,98
3	317	13,7698	0,3201	17,7375	33,93143	35,15
*	Média	13,7699	0,3201	17,7455	33,93131	34,31
*	DP	0,00012	5,8E-05	0,0346	0,00014	0,73301
*	CV	0,00084	0,01804	0,1947	0,00041	2,13643

TS –Tensão Superficial DP-Desvio Padrão CV –Coeficiente de Variação

Tabela 6. Condições de meios para biodegradação de querosene e produção de biossurfactante em água do mar por *C.lipolytica* UCP 0988 usando diferentes técnicas de otimização

Tipo Otim.	Técnica Otim.	Condições Otimizadas			Variável Otimizada	Validação		D	Desvio	
		pH	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)		Valor Prev.	Valor Exp		Padrão Médio	Relativo (%)
OUR	MSR-GD	10,80	1,52	12,60	BIO	9,46	10,20	-	0,37	7,25
	MSR-AG	13,77	2,38	24,76	(g/L)	23,51	22,45	-	0,53	4,72
	MSR-GD	2,91	2,64	5,53	TS (mN/m)	45,47	47,80	-	1,17	4,87
	MSR-AG	13,77	0,32	17,78		33,93	34,31	-	0,19	1,11
OMR	MSR-FD ^a	8,90	2,00	13,00	BIO (g/L) e TS (mN/m)	8,54	9,2	0,5	0,33	7,17
						42,4	44,5		1,05	4,72
	MSR-FD ^b	13,77	2,84	24,76		23,34	22,2	1	0,57	5,14
						35,87	37,8		0,97	5,11
	MSR-FD-AG ^c	13,77	2,38	24,76		23,54	22,4	1	0,57	5,09
						35,58	37,1		0,76	4,10
MSR- FD AG ^d	13,77	0,32	17,78	10,3	10,7	0,66	0,20	3,74		
				33,93	35,6		0,84	4,69		

OUR- Otimização Unirresposta OMR – Otimização Multirresposta MSR- Metodologia de Superfície de Resposta GD- Método Gradiente AG – Algoritmo Genético

FD – Função de deseabilidade a - fatores definidos nos valores ótimos previstos por FD b – fatores definidos nos valores médios c - fatores definidos na condição ótima para BIO prevista por AG d - fatores definidos na condição ótima para TS prevista por AG BIO – Biomassa TS – Tensão Superficial D- Deseabilidade

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1. Superfícies de resposta da concentração de biomassa do modelo ajustado aos dados do planejamento composto central: (a) interação da concentração de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio, (b) interação da concentração de sulfato de amônio e do pH e (c) interação da concentração de fosfato monobásico de potássio e pH.

Figura 2. Gráficos de superfícies de resposta da tensão superficial do modelo ajustado aos dados do planejamento composto central: (a) interação da concentração de sulfato de amônio e fosfato monobásico de potássio, (b) interação da concentração de sulfato de amônio e do pH e (c) interação da concentração de fosfato monobásico de potássio e pH.

Figura 3. (a) Melhores valores de biomassa (aptidão) em cada geração e (b) melhor condição operacional (solução) na geração atual

Figura 4. (a) Melhores valores de tensão superficial (aptidão) em cada geração e (b) melhor condição operacional (solução) na geração atual

Figura 5. Perfis para valor previsto da biomassa e desejabilidade: (a) fatores definidos no ponto ótimo, (b) fatores definidos no ponto central (valores médios)

Figura 6. Perfis para valor previsto da tensão superficial e desejabilidade: (a) fatores definidos nos valores ótimos identificados por AG para a biomassa (b) valores definidos nos valores ótimos identificados por AG para a tensão superficial

Figura 7 – Compromisso entre produção de biomassa e redução de tensão superficial obtido usando a abordagem MSR-FD-AG

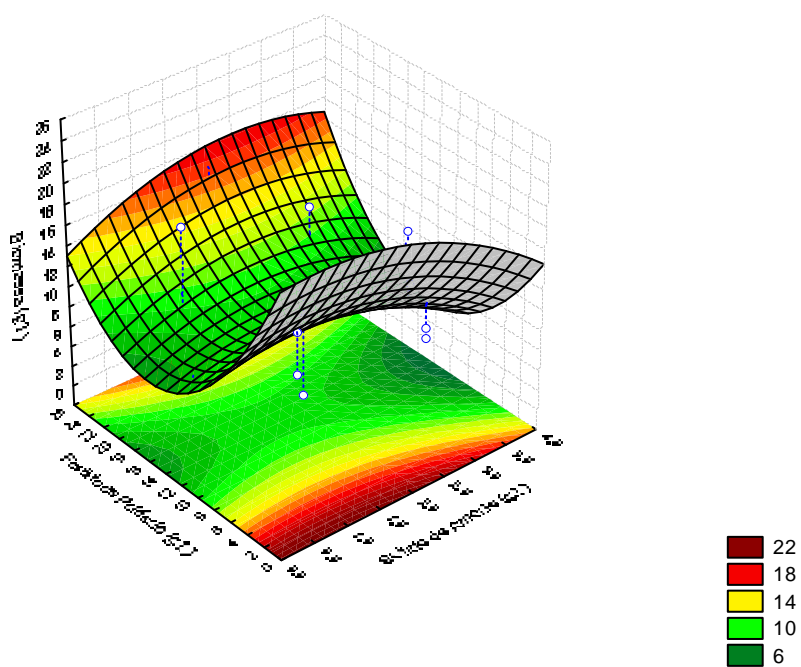


Figura 1(a)

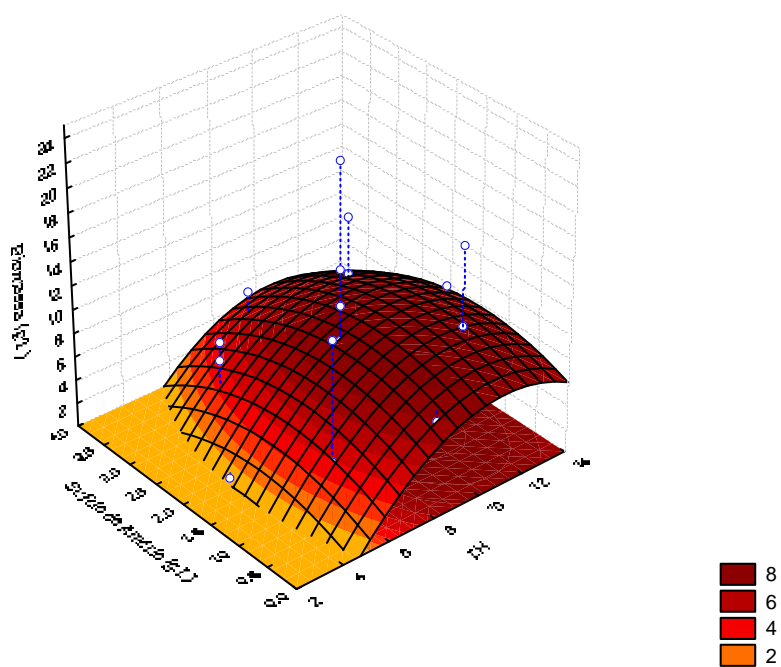


Figura 1(b)

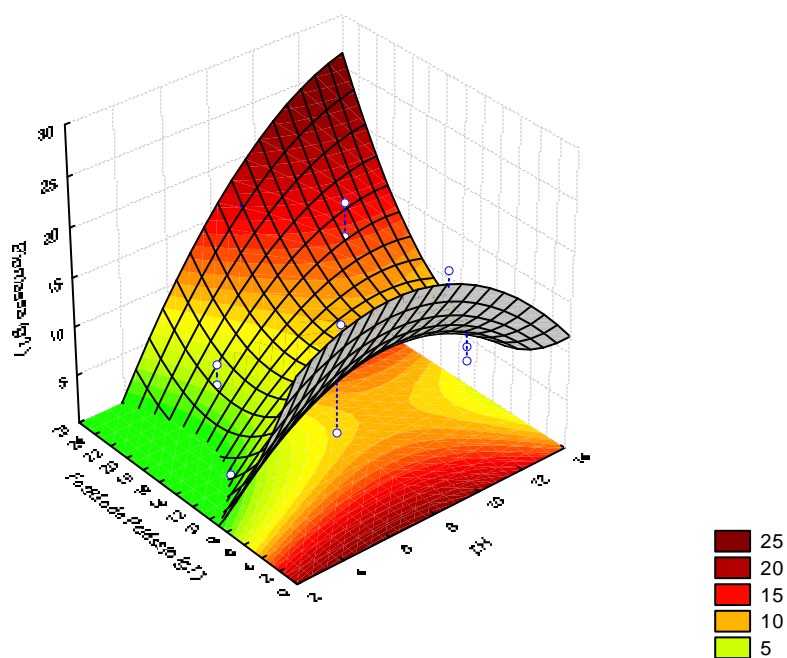


Figura1(c)

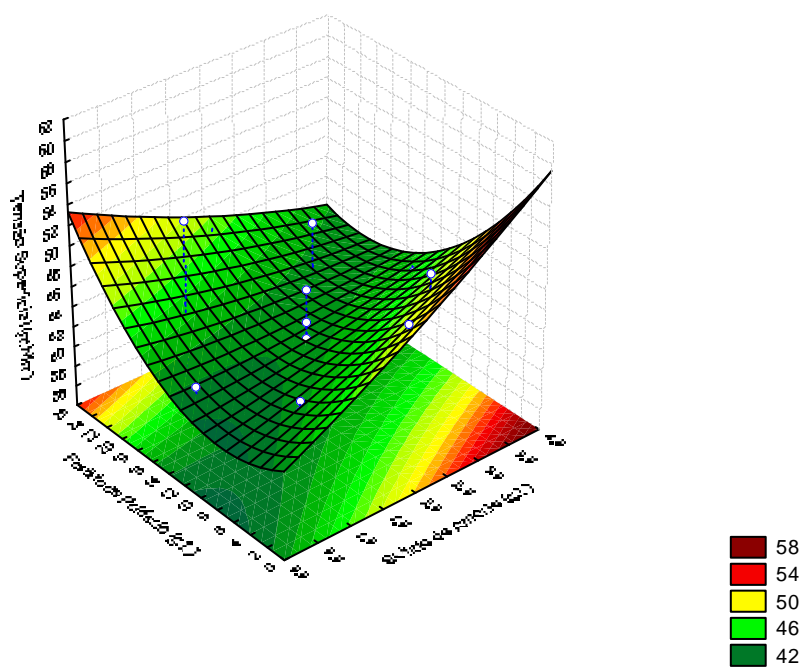


Figura 2(a)

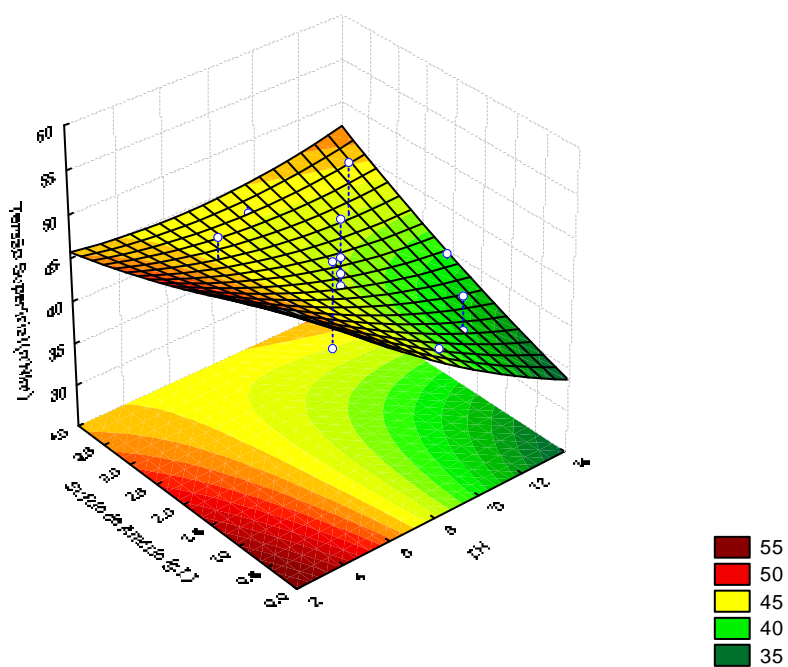
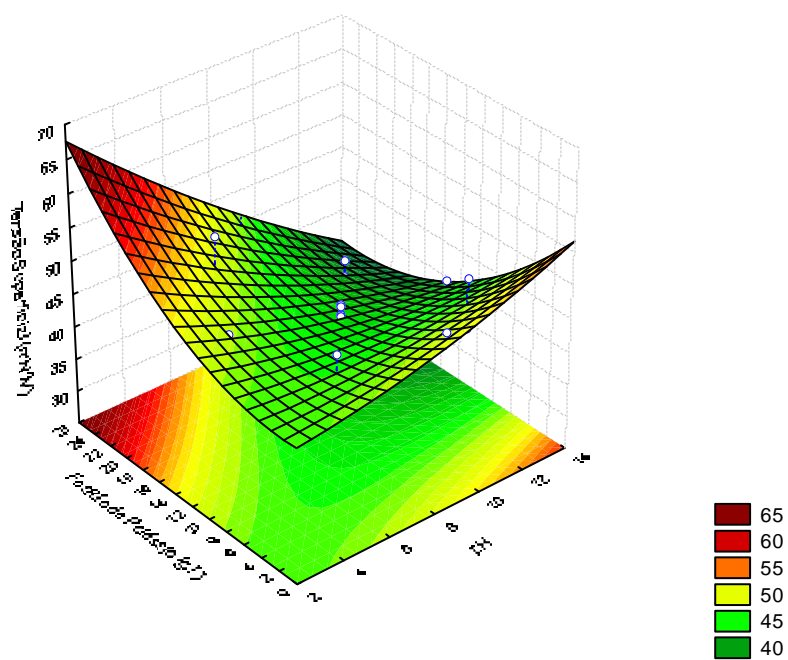


Figura 2(b)



2 Figura 2(c)

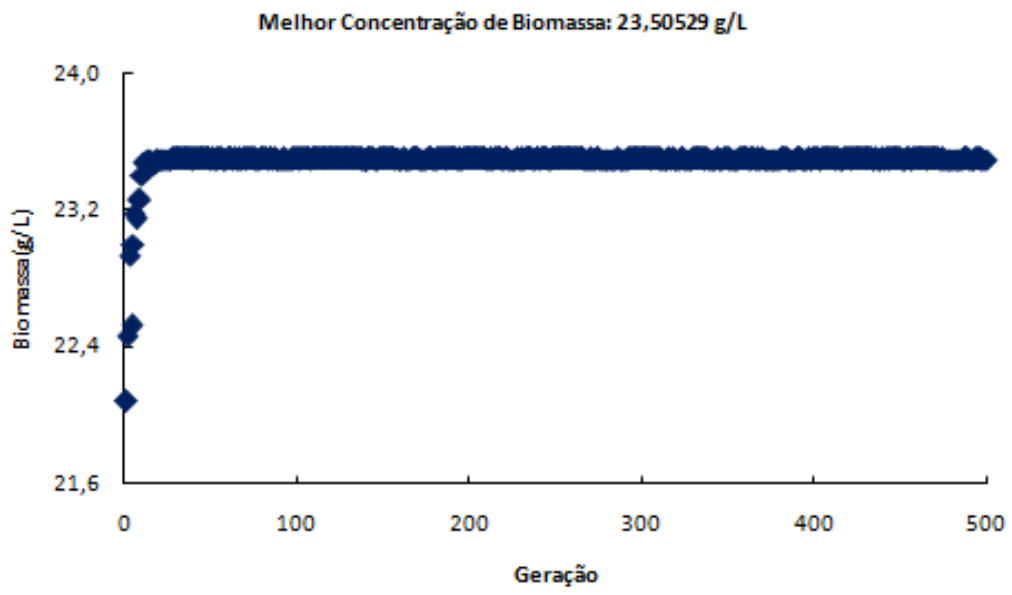


Figura 3(a)

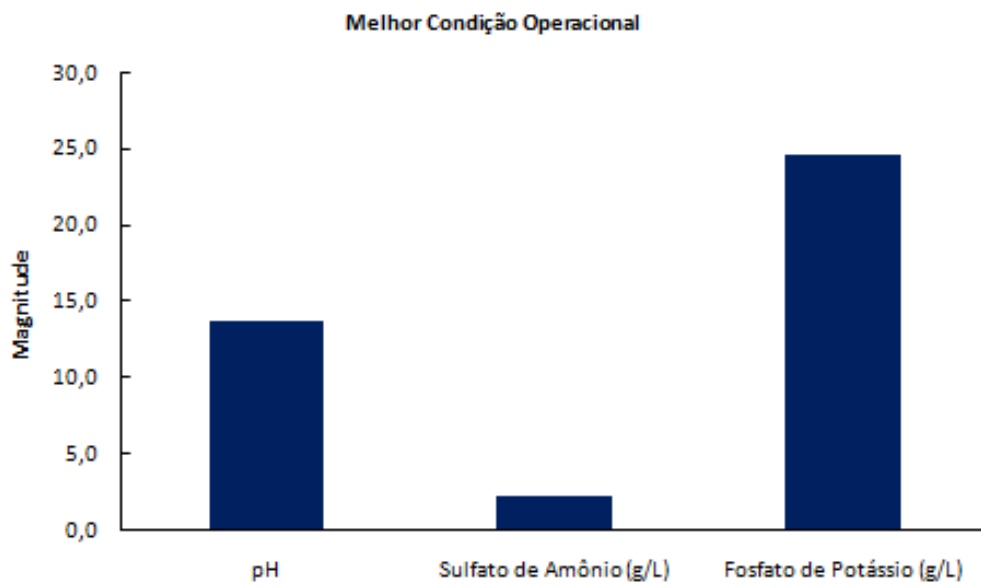


Figura 3(b)

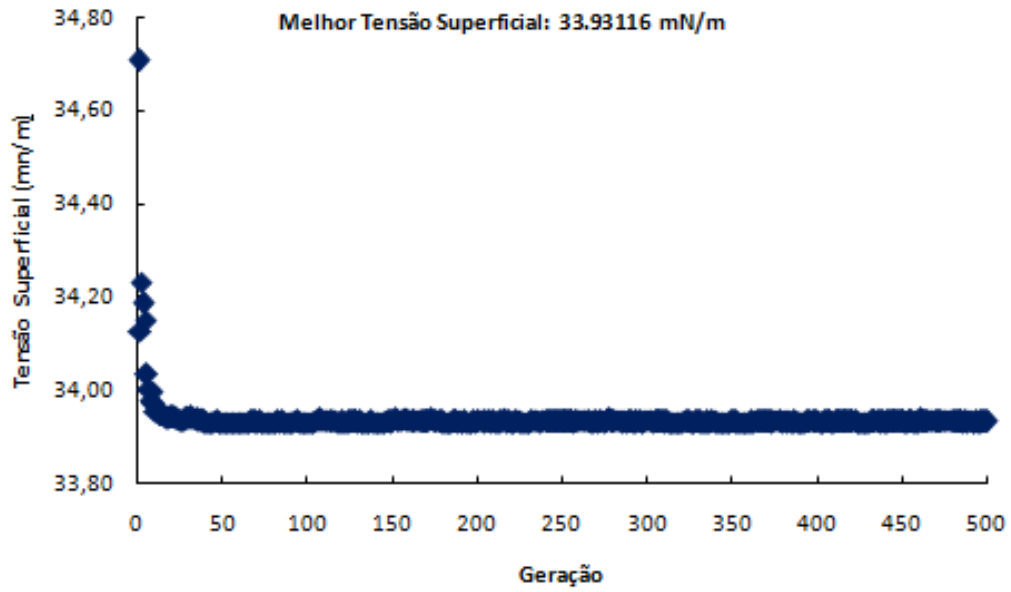
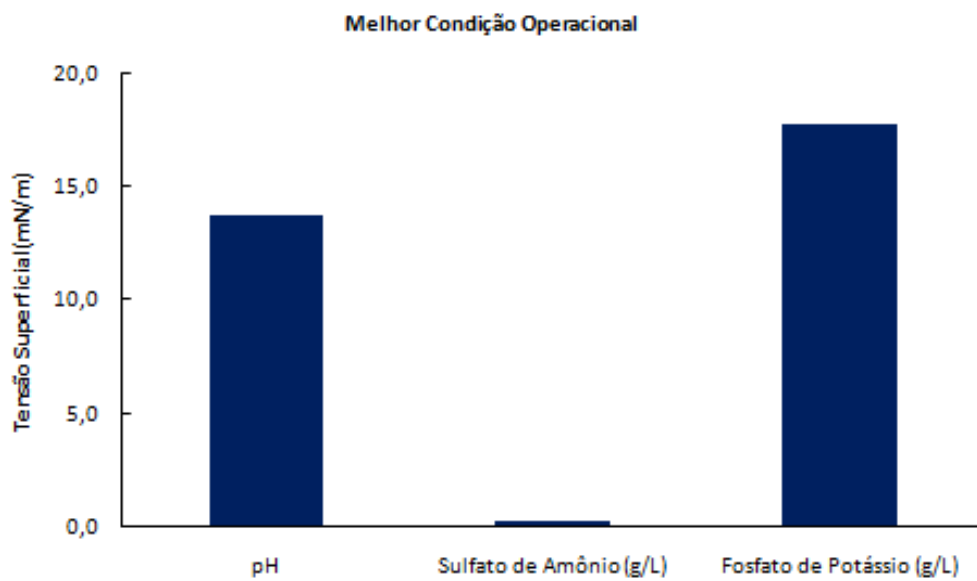


Figura 4(a)



(b)

C2 Figura 4(b)

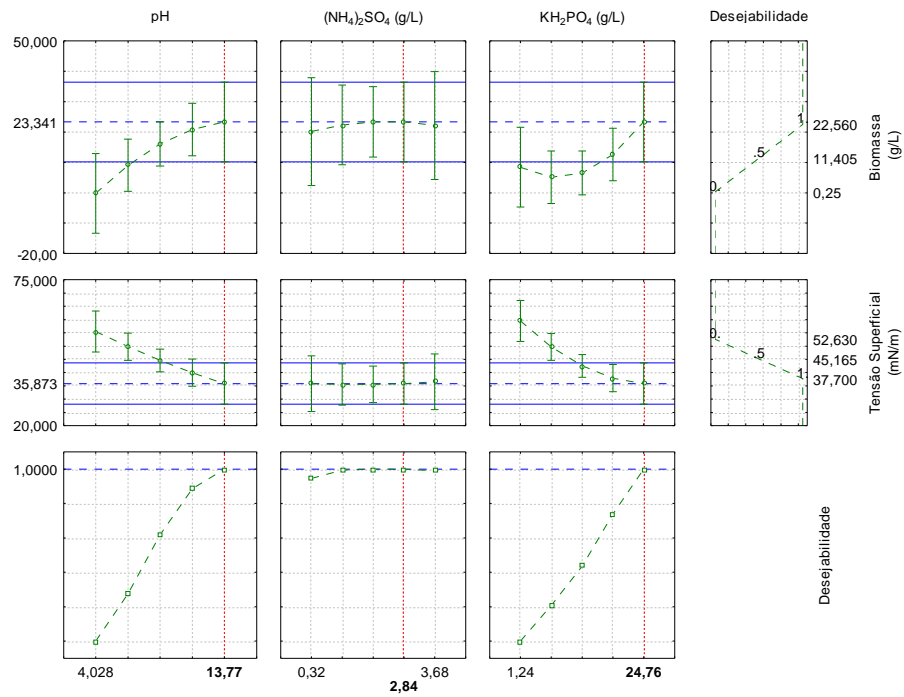


Figura 5(a)

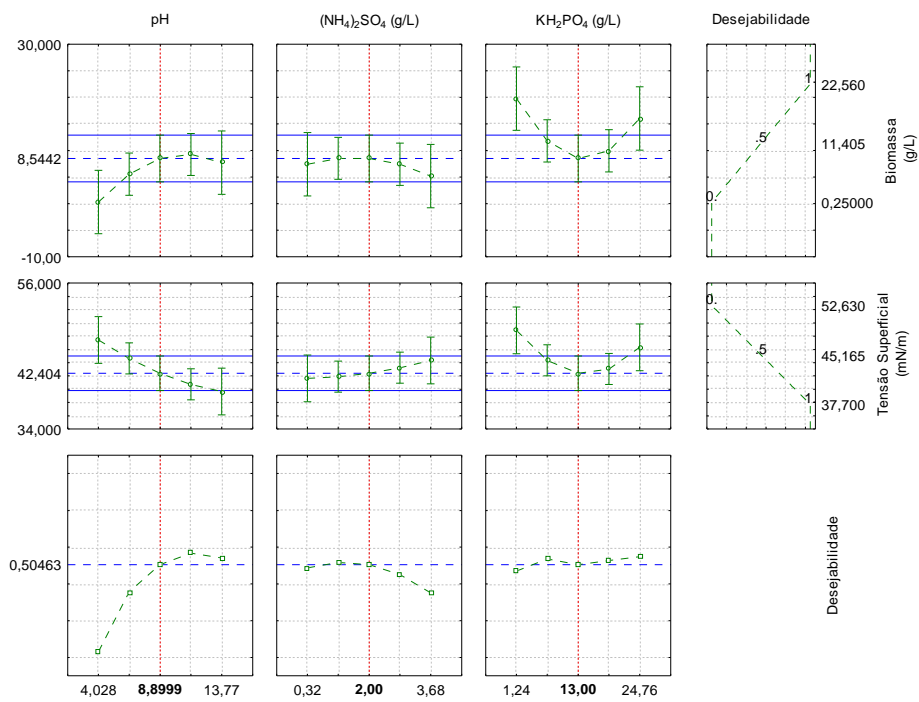


Figura 5(b)

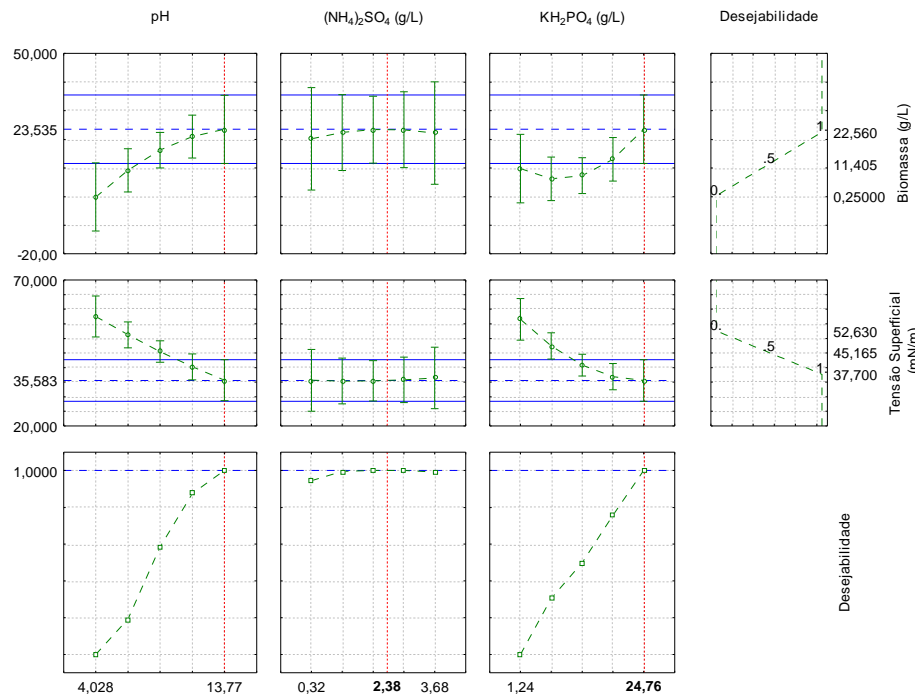


Figura 6(a)

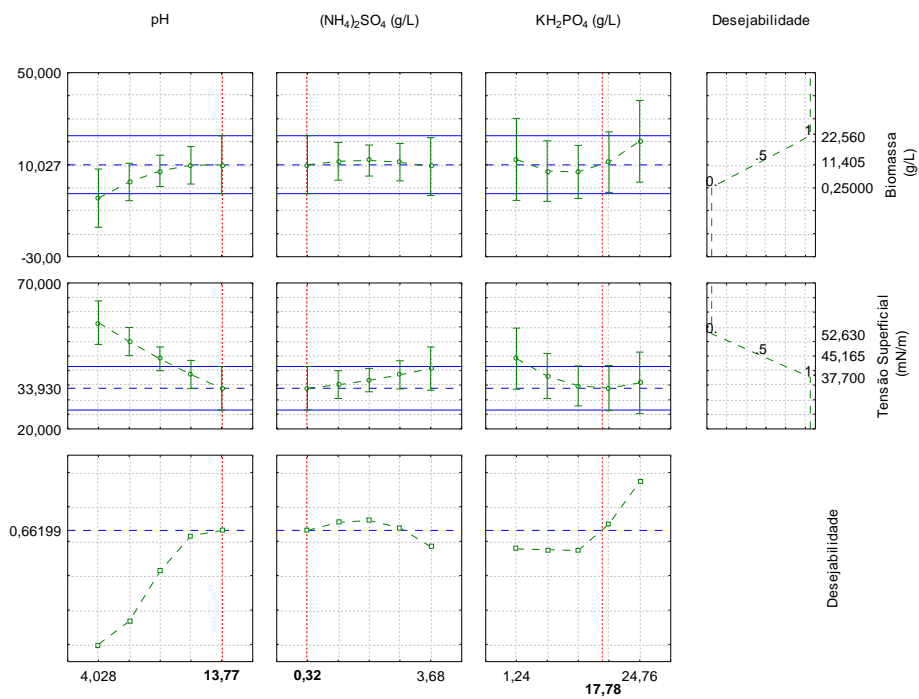


Figura 6(b)

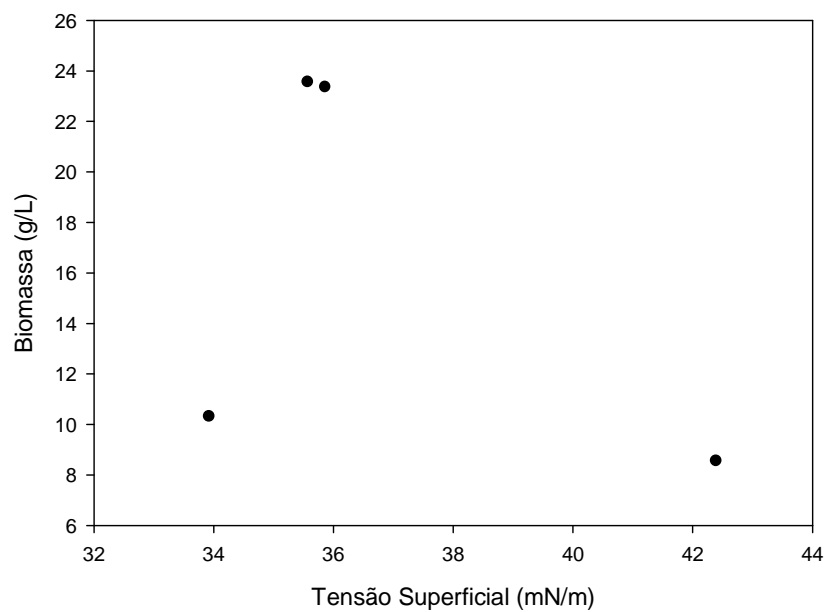


Figura 7