



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

Josué Félix de Araújo

PRODUÇÃO DE QUITOSANA E BIOEMULSIFICANTE
POR *Rhizopus microsporus* (UCP1304)
ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Recife-PE
2018

Josué Félix de Araújo

**PRODUÇÃO DE QUITOSANA E BIOEMULSIFICANTE
POR *Rhizopus microsporus* (UCP1304)
ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

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: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Rosileide Fontenele da Silva Andrade

**Recife-PE
2018**

A663p

Araújo, Josué Félix de

Produção de quitosana e bioemulsificante por *Rhizopus microsporus* (UCP 1304) através da fermentação submersa utilizando resíduos agroindustriais / Josué Félix de Araújo, 2018.

59 f. : il.

Orientador: Carlos Alberto Alves da Silva

Coorientador: Rosileide Fontenele da Silva Andrade

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco.

Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2018.

1. *Rhizopus microsporus*. 2. Quitosana. 3. Biotecnologia
4. Fermentação submersa. 5. Resíduos agroindustriais. I. Título.

CDU 574.6

PRODUÇÃO DE QUITOSANA E BIOEMULSIFICANTE POR *Rhizopus microsporus* (UCP 1304) ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Josué Félix de Araújo

Examinadores:

Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki (Membro Interno)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão (Membro Externo)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva (Orientador)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Defendida em: 27/07/2018

Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre me inspira e me fortalece, é meu tudo.

À Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki, pela pessoa maravilhosa e pelos seus conhecimentos transmitidos, ao longo da minha estrada.

Ao professor Dr. Carlos Alberto Alves, por sua orientação.

A Professora Dra Kaoru Okada pela oportunidade.

A professora Rosileide Fontenele, pela orientação, paciência, dedicação e auxílio nos momentos mais complexos já vividos na bancada e na edição do trabalho. Pra sempre minha admiração.

A professora Norma Buarque de Gusmão por importantes direcionamentos.

Ao Amigo Rafael Kabrosi, pela força e luz ofertada em momento certo, minha eterna gratidão.

Ao Amigo de Turma, Bezerra, Israel, grande força e de bancada Marcos, Daely meu muito obrigado!

Aos funcionários Sônia, secretária do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais–NPCIAMBUNICAP; Sr. Humberto e André que foram mais que simples funcionários, e sim amigos, sempre prestativos.

À Universidade Católica de Pernambuco, pelo acesso aos laboratórios do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais para realização deste trabalho.

À CAPES pelo estímulo a pesquisa e a FACEPE pela bolsa de pesquisa, sem a qual seria impossível concluir tão relevante estudo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3. REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 Quitina e quitosana	15
3.1.1 Quitina	15
3.1.2 Quitina e celulose	16
3.1.3 Quitina fungica	18
3.1.4 Desacetilação da quitina	18
3.2 Quitosana	19
4. BIOEMULSIFICANTES	22
4.1 Propriedades dos bioemulsificantes	22
4.1.1 Emulsões	24
4.1.2 Tipos de emulsões	24
4.1.3 Fontes alternativas para produção de bioemulsificante	25
4.1.4 Micro-organismos produtores de bioemulsificantes	25
4.1.5 Biosulfactante e bioemulsificantes	26
5. SUBSTRATOS ALTERNATIVOS	27
5.1 Novos modelos economicos e sustentaveis para a pesquisa cientifica	27
5.2 Relatos de casos com uso de substratos alternativos	27
5.3 Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) residual como substrato alternativo.	28
5.4 O Melaço da cana-de-açúcar	30
5.5 Resíduo de Malte	31
5.6 Desenvolvimento tecnológico sustentável e resíduos de baixo custo	32
6. FUNGOS	33
6.1 Zigomyceto	33
6.2 Mucorales	34
6.3 Gênero <i>Rhizopus</i>	34
6.4 <i>Rhizopus microsporus</i>	35
REFERÊNCIAS	36
CAPÍTULO II	40
1. Introdução	41
2 Material e Métodos	42
3. Resultados e Discussões	47
4 Conclusão	54
Referências bibliográficas	54

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 – Estrutura da Quitina.....	16
Figura 2 – Diferenças estruturais entre Quitina e Celulose	17
Figura 3 – Estrutura da quitina e suas ligações glicosídicas	17
Figura 4 – Estrutura da parede celular fungica.....	18
Figura 5 – Desacetilação de Quitina em Quitosana	19
Figura 6 – Estrutura da Quitosana.....	20
Figura 7 – Esquema de estrutura bipolar de bioemulsificante	22
Figura 8 – Esquema da quebra da tensão superficial	23
Figura 9 – Microemulsão A/O e O/A	24
Figura 10 – Emulsões tipo A/O e O/A.....	24
Figura 11 – <i>Rhizopus sp</i>	34

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Diagrama de Pareto para avaliação da temperatura, e da agitação na produção de quitina e quitosana por <i>Rhizopus microsporus</i> : (A) Influência na produção de quitina e (B) Influência na produção de quitosana (C) Influência na produção da Biomassa	50
Figura 2 – Emulsão do tipo A/O formada pelo bioemulsificante de <i>Rhizopus microsporus</i> (A) comparado à emulsão tipo A/O (B) e emulsão tipo O/A, descritas pela literatura. Aumento 40X.....	52
Figura 3 – Estabilidade do bioemulsificante de <i>Rhizopus microsporus</i> na viscosidade de óleo queimado de motor: (A) Diferentes concentrações de NaCl, (B) Diferentes pH e Diferentes temperaturas (C)	53

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Fungos produtores de bioemulsificantes.....	25
Tabela 2 – Composição química do tomate em 100g.....	30
Tabela 3 – Composição química do melão	31
Tabela 4 – Composição química do grão da Cevada	32

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Composição dos principais compostos presentes no meio de produção	43
Tabela 2 – Matriz do planejamento fatorial de 2^2	46
Tabela 3 – Produção de quitina e quitosana por <i>Rhizopus microsporus</i> UCP 1304) em meio contendo caldo de tomate (0,03%), melão e bagaço de malte comparados com os registros da literatura.....	49
Tabela 4 – Efeito da temperatura e agitação na produção de biomassa, quitina e quitosana por <i>Rhizopus microsporus</i> de acordo com a matriz decodificada do planejamento experimental de 2^2	50
Tabela 5 – Produção de bioemulsificante por <i>Rhizopus microsporus</i> avaliados pela tensão superficial (TS) e índice de emulsificação (IE ₂₄)	52

RESUMO

A utilização de substratos alternativos antes descartados no meio ambiente, vem sendo reaproveitados na formulação de meios para produção de diversos produtos biotecnológicos como quitosana e bioemulsificantes. Neste trabalho foi investigado a produção simultânea de quitosana e bioemulsificante, a partir do cultivo de *Rhizopus microsporus* UCP 1304, em meio contendo bagaço de malte, melaço e caldo de tomate como resíduos agroindustriais, através da fermentação submersa. Biomateriais baseados em quitosana constituem uma classe emergente com aplicação em vários campos abertos à exploração por micro-organismos como as leveduras e fungos. A quitosana fungica apresenta menor toxicidade e melhor compatibilidade frente a quitosana de crustáceos. Um bioemulsificante obtido a partir de meio formulado por substratos alternativos representa maior economicidade e melhor sustentabilidade, constitui numa alternativa viável e uma nova tendência mundial para a pesquisa científica, e desperta o interesse industrial. Os resultados obtidos evidenciam que *Rhizopus microsporus*, foi capaz de biotransformar resíduos agroindustriais, com importante rendimento em biomassa, quitina; quitosana de biomassa e produção de bioemulsificante a partir de substrato alternativo.

Palavras-Chave: Caldo de tomate, Bioemulsificante, Substratos alternativos, *Rhizopus microsporus*.

ABSTRACT

The use of alternative substrates previously discarded in the environment has been interesting for being reused in the formulation of means of production in biotechnological materials such as chitosan and bioemulsifiers. In this work was investigated the simultaneous production of chitosan and bioemulsifier, from the cultivation of *Rhizopus microsporus* UCP 1304, in a medium containing malt bagasse, molasses and tomato broth as agroindustrial waste, through submerged fermentation. Chitosan-based biomaterials constitute an emerging class with application in various fields opened to exploration by micro-organisms such as yeasts and fungi. Fungal chitosan has less toxicity and better compatibility compared to crustacean's chitosan. The bioemulsifier obtained from a medium formulated by alternative substrates represents greater economics and better sustainability, besides constitute a viable alternative and a new world tendency for scientific research and arouses the industrial interest. The results showed that *Rhizopus microsporus*, was able to biotransform agroindustrial wastes, demonstrating an important yield in biomass, chitin, biomass chitosan and bioemulsifier production from alternative substrates.

Key words: Tomato broth, Bioemulsifier, Alternative substrates, *Rhizopus microsporus*

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Quitina e quitosana são polímeros atóxicos, biodegradáveis, biocompatíveis e podem ser produzidos a partir de fontes naturais e renováveis. Suas aplicações industriais e tecnológicas nas áreas médicas odontológicas, estéticas e comerciais são de extrema relevância. Biomateriais baseados em quitosana constituem uma classe emergente com aplicação em vários campos abertos como na produção de biomulsificantes, e na biorremediação, com histórico de pesquisas há quase setenta anos. Sua estrutura é constituída por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas β . derivada da desacetilação da quitina (CAMPOS-TAKAKI *et al.*, 2009; BERGER, *et al* 2012).

Essas biomoléculas apresentam grande potencial biotecnológico, excelente biocompatibilidade, bioatividade; biodegradabilidade, reatividade do grupo amino desacetilado, permeabilidade seletiva, ação polieletrólítica, atividade antimicrobiana, habilidade em formar gel e filme, habilidade de quelar e capacidade adsorptiva, destacando as áreas que podem ser utilizadas como, biomedicina, nutrição, alimentos, farmacologia, microbiologia, agricultura e cosméticos (ANDRADE *et al.*, 2003; RECK *et al.*, 2018).

Segundo o relato a quitosana foi produzida industrialmente pela primeira vez em 1971 no Japão, entretanto, em 1986 já era explorada por aproximadamente quinze indústrias produtoras de quitina e quitosana em escala comercial e a muito tempo movimentam importantes setores da economia global (HIRANO, 1989).

O exoesqueleto de camarão é principal fonte para a produção da quitosana que é submetida às etapas de desmineralização, desproteinização, desodorização e secagem. É um processo que envolve maior complexidade, muito gasto de água e odorização característica. Entretanto os fungos da ordem Mucorales, em especial os Zygomycetes, apresentam importantes relatos de produção de quitosana com melhor compatibilidade nenhuma toxicidade (CAMPOS TAKAKAI, 2005; CARDOSO *et al*, 2012).

Os bioemulsificantes são biomolécula produzida a partir da ação de Mucorales em substratos alternativos que merecem destaque. Definidos como compostos anfipáticos que podem ser utilizados nos processos que envolvem biodegradação de

hidrocarbonetos possuem a capacidade de auxiliar de redução da tensão superficial entre líquidos imiscíveis. Os bioemulsificante constituem uma classe que tem muito a apresentar para a indústria tecnológica (SINDHU, 2016; AMORIM, 2015).

Meios de cultura sintéticos para cultivo de Zygomycetos para a produção de quitina e quitosana, tem sido utilizados por diversos autores (POCHANAVANICH; SUNTORNSUK, 2002; CARDOSO *et al.*, 2012). Entretanto nos últimos anos, meios com substratos alternativos tem demonstrado sua viabilidade para produção em larga escala destes biopolímeros (STAMFORD *et al.*, 2008; KLEKAYAI; SUNTORNSUK, 2010; BERGER *et al.*, 2012; FAI *et al.*, 2011; CARDOSO *et al.*, 2012).

Substratos alternativos têm sido amplamente utilizados, de acordo com a literatura, para formulação de meios que favoreçam a produção de bioprodutos, que apresentem composição rica em minérios e sejam compatíveis com as condições econômicas e ecológicas (STAMFORD, 2012).

O fungo *Rhizopus microsporus* (UCP 1304) é um fungo da ordem Mucorales e com histórico de produção de bioemulsificantes e biomoléculas. Os Mucorales fazem parte de um grupo de fungos filamentosos que, apresentam parede celular constituída por quitina e quitosana, e micélio geralmente cenocítico, com septos apenas na delimitação dos órgãos de reprodução (PELE *et al.*, 2018).

O genero *Rhizopus*, apresenta relatos de serem mais adaptáveis a este tipo de processo produtivo, inclusive com substratos alternativos, isso se deve as suas propriedades fisiológicas, enzimológicas e bioquímicas (PELE *et al.*, 2018).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Produzir quitosana e bioemulsificante por *Rhizopus microsporus* (UCP1304) isolado da caatinga do estado de Pernambuco, empregando fermentação submersa e resíduos agroindustriais como substratos alternativos.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a influência dos substratos, caldo de tomate, bagaço malte e melaço no crescimento de *Rhizopus microsporus*;
- Aplicar um planejamento fatorial de 2^2 para produção de biomassa e quitosana no meio com substratos alternativos;
- Investigar a produção de bioemulsificante na condição selecionada do planejamento fatorial;
- Identificar o potencial do bioemulsificante como agente dispersante;
- Avaliar as propriedades físico-químicas e biológicas da quitosana e do bioemulsificante.

3. REVISÃO DA LITERATURA

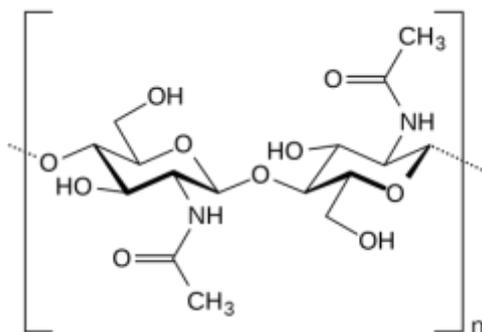
3.1 Quitina e quitosana

Quitina e quitosana, apresentam grande potencial biotecnológico, excelente biocompatibilidade, bioatividade; biodegradabilidade, reatividade do grupo amino desacetilado, permeabilidade seletiva, ação polieletrólítica, atividade antimicrobiana, habilidade em formar gel e filme, habilidade de quelar e capacidade adsorptiva, destacando as áreas que podem ser utilizadas como, biomedicina, nutrição, alimentos, farmacologia, microbiologia, agricultura e cosméticos. A capacidade quelantes permite seu emprego na remoção de metais pesados; no tratamento de efluentes; na agricultura; como fungicida; como aditivos alimentares; materiais biomédicos; na medicina e odontologia; na indústria farmacêutica; em cromatografia; na preparação de colunas; na imobilização de enzimas, etc. (ANDRADE *et al.*, 2003; RECK *et al.*, 2018).

A literatura descreve a importância valiosa, na área da biotecnologia, das biomoléculas quitina e quitosana, que são produzidas comercialmente para diversos fins, também apresentam aplicações diretas devido à sua composição química única, sequestra ions metálicos e complexos metálicos de soluções. (KUO; TSAI, 2010; PAREEK *et al.*, 2011; SALAM *et al.*, 2011; ABU-ELREESH; ABD-EL-HALEEM, 2014).

3.1.1 Quitina

A quitina é um polissacarídeo estrutural formado a partir de cadeias de glicose modificada. A quitina é encontrada nos exoesqueletos de insetos, nas paredes celulares dos fungos e em certas estruturas duras em invertebrados crustáceos e peixes. Em termos de frequência, a quitina é o segundo biopolímero de maior abundância na natureza apenas superada pela celulose. Na biosfera, mais de 1 bilhão de toneladas de quitina são sintetizadas a cada ano pelos organismos. Essa molécula (Figura 1) extremamente versátil pode formar estruturas sólidas por conta própria, como nas asas de insetos, ou pode combinar-se com outros componentes, como o carbonato de cálcio, para produzir substâncias ainda mais fortes, como a casca de um molusco (ANDRADE, *et al* 2003; SILVA 2010)..

Figura 1- Estrutura da Quitina

Fonte: <http://www.fcencias.com/2014/05/15/quitina-molecula-da-semana/>. Acesso em: 18 fevereiro de 2018.

3.1.2 Quitina, queratina e celulose- aspectos e importância.

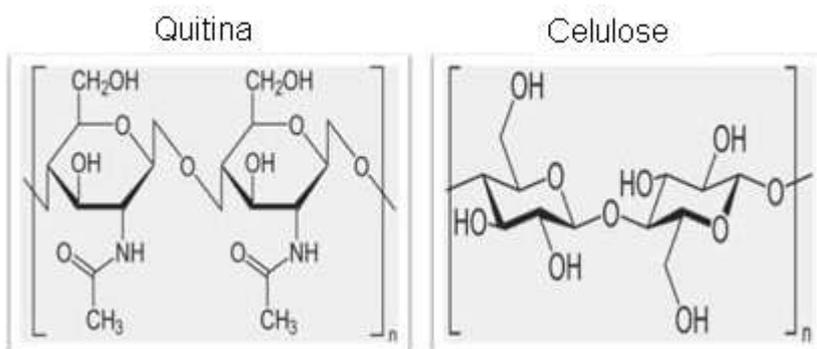
Como ocorre com a celulose, nenhum animal vertebrado pode digerir a quitina por conta própria. Animais que alimentam-se de insetos geralmente têm bactérias e protozoários que podem quebrar a quitina fibrosa nas moléculas de glicose. No entanto, como a quitina é uma molécula biodegradável que se dissolve ao longo do tempo, ela é usada em diversas aplicações industriais, como fios cirúrgicos e aglutinantes para corantes e colas. (ANDRADE, 2003; DALAN, 2005).

A quitina, semelhantemente a celulose e a queratina, são polímeros estruturais formados a partir de monômeros menores, ou monossacarídeos. Os polímeros estruturais formam fibras fortes. Quando secretadas dentro ou fora das células de forma organizada, as fibras formam ligações fracas entre si. Isso adiciona força a toda a estrutura. A quitina e a celulose são feitas de monômeros de glicose, enquanto a queratina é uma proteína fibrosa. Os vários polímeros estruturais surgiram no início da evolução da vida, porque são vistos apenas em certos grupos. A celulose é exclusiva para plantas, queratina para animais e quitina para artrópodes, moluscos e fungos. A celulose e a quitina evoluíram precocemente na história da vida, enquanto a queratina surgiu em certos animais muito tempo depois que as plantas e os fungos se ramificaram dos outros eucariotos (SILVA, 2010).

A diferença entre a quitina e a celulose (Figura 2) é devido à substituição que ocorre na molécula de glicose. Em vez de um grupo hidroxila (OH), as moléculas de glicose na quitina possuem um grupo amida ligado que consiste de carbono e nitrogênio. O nitrogênio é uma molécula eletricamente positiva, enquanto o oxigênio ligado duplamente ao grupo é eletricamente negativo. Isso produz um dipolo na

molécula, o que aumenta as ligações de hidrogênio que podem se formar entre essas moléculas e as moléculas ao seu redor. Quando combinada em uma matriz com vários compostos e outras moléculas de quitina, a estrutura resultante pode ser muito difícil devido a todas as interações fracas entre moléculas próximas (SILVA, 2010; BERGER, 2011).

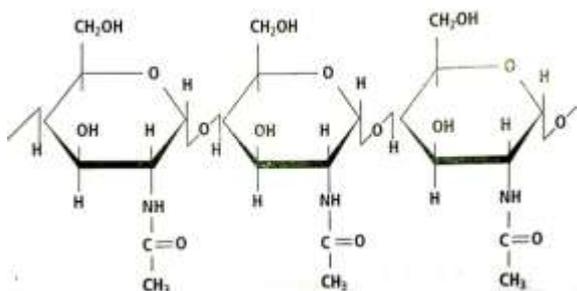
Figura 2- Diferenças estruturais entre Quitina e Celulose



Fonte: <http://www.easybiologyclass.com/kingdom-fungi-general-characteristics-key-points-with-ppt/>. Acesso em: 18 Fevereiro 2018.

A quitina (Figura 3) é composta de monossacarídeos de glicose modificados. A glicose existe como um anel de moléculas de carbono e oxigênio. Ligações entre moléculas de glicose são conhecidas como ligações glicosídicas. Os oxigênios que normalmente formam grupos hidroxila ligados ao anel de carbono também podem formar uma ligação com outro carbono em vez de um hidrogênio. Desta forma, os monossacarídeos podem ser ligados em longas cadeias. A quitina é formada por uma série de ligações glicosídicas entre moléculas de glicose substituídas. (STAMFORD, *et al* 2012)

Figura 3 – Estrutura da quitina e suas ligações glicosídicas

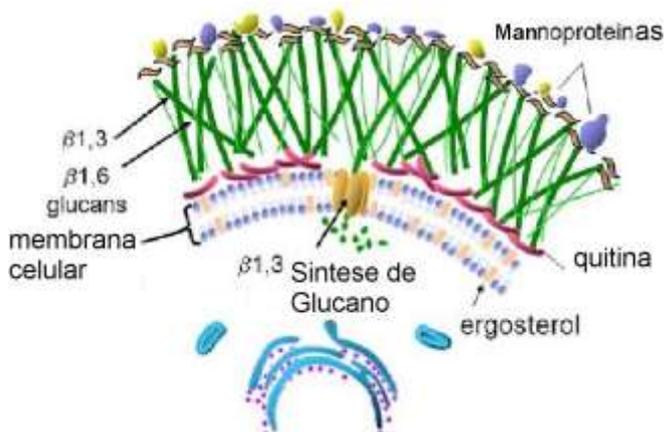


Fonte: <https://cibertareas.info/quitina-temas-selectos-de-quimica-2.html>. Acesso em: 18 Fevereiro 2018.

3.1.3 Quitina fúngica

Nos fungos, a quitina é usada na formação da parede celular.(Figura 4). Assim como a celulose é parte estrutural nas plantas, a quitina é depositada extracelularmente com proteínas e outras moléculas nos fungos. Isso forma uma parede celular rígida entre as células, o que ajuda os organismos a manter sua forma. Assim como nas células vegetais, a água pode ser retida nas células para criar pressão de água contra a parede celular. Isso é conhecido como pressão de turgor e aumenta a força de cada célula. Isso vem em parte da força da quitina como uma fibra estrutural (ANDRADE *et al* 20030; BERGER, 2014; SILVA, 2010).

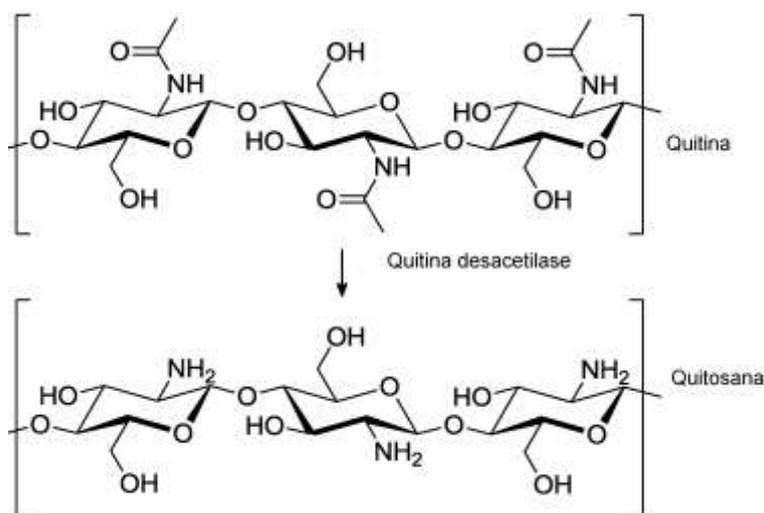
Figura 4 – Estrutura da parede celular fungica



Fonte: <http://slideplayer.com.br/slide/7967376/>. Acesso em: 19 fevereiro 2018.

3.1.4 Desacetilação da quitina

A desacetilase do biopolímero quitina foi descoberto a partir de experimentos com extratos do fungo *Mucor rouxii*. Descobriu-se ainda que a enzima estava associada à síntese que ocorre na parede celular, convertendo a quitina em quitosana. A partir de então, foram identificadas diferentes desacetilases (Figura 5) de quitina fúngicas (BERGER, 2012; ANDRADE, 2012)..

Figura 5 – Desacetilação de Quitina em Quitosana

Fonte: <http://www.mdpi.com/2073-4344/3/4/914Chitosan>. Acesso em: 18 Fevereiro 2018

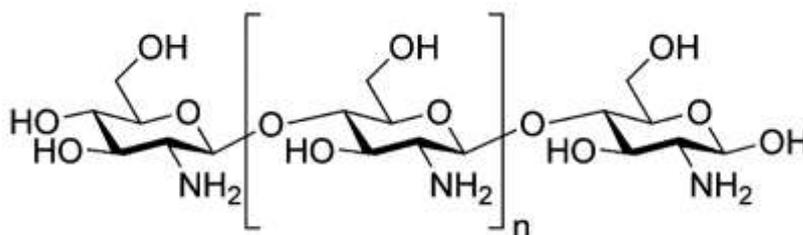
A metodologia utilizada para a extração de quitina e quitosana fúngica também pode influenciar no rendimento final destes biopolímeros conforme relatado por LINS *et al.* (2010). Esses autores observaram que entre alguns fungos da espécie *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus arrhizus*, mostraram maiores valores de biomassa (8,0 e 13,1 g/L, respectivamente) em meio de cultura com milhocina 4%, além disso, há métodos de extração de quitina e quitosana diferentes com maior rendimento de quitosana, como o descrito por ZAMANI *et al.* (2007) que extraiu, da maioria das biomassas, relativa quantidade de quitina.

3.2 Quitosana

A quitosana exibe uma variedade de propriedades fisicoquímicas e biológicas interessantes, é solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos. Isto, em combinação com a sua não-toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, adequados para a sua utilização em inúmeras aplicações na agricultura, cosméticos, tratamento de água e na medicina, é um polímeros atóxicos, possui propriedades biodegradáveis, biocompatíveis e podem ser produzidos a partir de fontes naturais e renováveis. Suas aplicações industriais e tecnológicas nas áreas médicas odontológicas, estéticas e comerciais são de extrema relevância são exploradas há quase setenta anos. Sua estrutura é constituída por unidades de 2- acetamido-2- deoxi-Dglicopiranosose e 2-amino-2- deoxi-D-glicopiranosose unidas por ligações

glicosídicas β . Como um heteropolímero de GlcNAc e resíduos de D-glucosamina, a quitosana (Figura 6) é um polímero linear de β -1,4-D-glicosamina, ligado por resíduos de N-acetil-D-glicosamina, intramolecular, derivada da desacetilação da quitina (CAMPOS-TAKAKI *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2012).

Figura 6 – Estrutura da Quitosana



Fonte: <http://www.torolis.com/conocimiento/componentes/>. Acesso em: 21 janeiro 2018.

O grande potencial biotecnológico da quitosana permite habilidade de quelar e capacidade adsortiva, destacando as áreas que podem ser utilizadas como, biomedicina, nutrição, alimentos, farmacologia, microbiologia, agricultura e cosméticos (ANDRADE *et al.*, 2003).

As propriedades fisicoquímicas e biológicas interessantes da quitosana despertam muito interesse na pesquisa científica. A quitosana é solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos. Isto, em combinação com a sua não-toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, faz da quitosana, e também quitooligosacarídeos (COSS), adequados para a sua utilização em inúmeras aplicações na agricultura, cosméticos, tratamento de água e na medicina, e recentemente tem sido usada no desenvolvimento de nanomateriais, bioadesivos e revestimentos comestíveis devido a sua ampla capacidade bioquímica (WU *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2012; KARAGOZLU; KIM, 2014).

A natureza catiônica da quitosana é bastante interessante, já que a maioria dos polissacarídeos é geralmente neutra ou carregada negativamente em um ambiente ácido. Esta propriedade permite formar complexos eletrostáticos ou estruturas constituídas por multicamadas com outros polímeros sintéticos ou naturais carregados negativamente. Há relatos que a quitosana tem outras propriedades biológicas, tais como atividade antitumoral, antimicrobiana e antioxidante (WU, 2010).

A comercialização da quitosana como um suplemento dietético ou nutracêutico tem como objetivo diminuir o colesterol sérico e controlar a obesidade corporal, a Quitosana não é digerida no nosso trato gastrointestinal, e promove a sensação de saciedade ao encher fisicamente o estômago. Ao inibir a atividade da lipase pancreática, pode reduzir a absorção de gordura dietética nos intestinos. Além disso, pode ligar e precipitar a gordura nos intestinos para que não seja absorvida, se liga com grupos carboxílicos aniônicos de ácidos graxos e ácidos biliares, e também interfere na emulsificação de lipídios neutros, como colesterol e outros esteróis, ligando-os à interação hidrofóbica, reduzindo assim a absorção de gordura e colesterol do trato gastrointestinal, favorecendo a redução de gordura e diminuição dos níveis de colesterol (YLITALO *et al* 2002; HEBER, 2003).

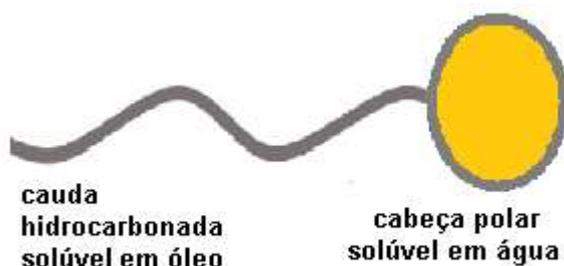
4. BIOEMULSIFICANTES

Destaque também deve ser dado aos bioemulsificantes por sua relevância, são compostos que reduzem principalmente a tensão interfacial entre líquidos imiscíveis ou em as interfaces sólido-líquido que levam à formação de emulsões mais estáveis, podem ser chamadas também de bioemulsanos. Os bioemulsificantes são caracterizados também por sua estrutura de alto peso molecular que lhe confere algumas características próprias. A combinação de polissacarídeos, ácidos graxos e componentes de proteínas em bioemulsificantes confere-lhes melhor potencial de emulsão e capacidade de estabilizar emulsões. Também é importante notar que alguns bioemulsionantes eficientes consistem apenas em polissacarídeos e proteínas (PANESAR, 2015).

São classificados como bioemulsificantes os polímeros de polissacarídeos de alto peso molecular, lipopolisacarídeos ou lipoproteínas lipopolisacarídeos ou lipoproteínas: RAG-1 Emulsan; BD-4 Emulsan; Alasan; Manoproteínas; Acido Urônico (PANDEY, 2000).

Bioemulsificantes (Figura 7) são compostos, de origem orgânica, produzidos por micro-organismos, leveduras fungos e bactérias. Constituídos por moléculas anfipáticas, cuja estrutura apresentam constituição hidrofílicas e hidrofóbicas, capazes de reduzir a tensão superficial e a tensão Interfacial, promovendo uma relação típica de superfície líquido – líquido, com capacidade emulsificante, exibem atividades emulsionantes, devido à sua origem biológica, são considerados menos tóxicos e mais facilmente biodegradáveis, o que implica uma maior compatibilidade ambiental. Os bioemulsificantes possuem a capacidade de diminuir a tensão superficial agindo como agente emulsificante.

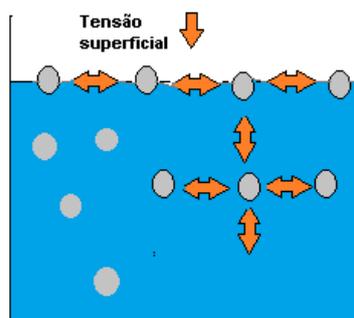
Figura 7 – Esquema de estrutura bipolar de bioemulsificante



Acidentes ecológicos provocados por agentes poluidores, que afetam rios mares e afluentes, decorrentes das ações da indústria petrolífera, tem motivado a busca por soluções viáveis para um controle sustentável e efetivo que ajude a eliminar os males decorrentes dessas ações nocivas ao meio ambiente. Estudos revelam a influencia de biomoléculas num processo de bioemulsificação capazes de contribuir para a redução de agentes poluidores, como os hidrocarbonetos de forma sustentável (LEIVA-CANDIA, 2014).

A capacidade de diminuir a tensão superficial e interfacial é por adsorção de biossurfactante nas diferentes fases, causando mais interação e mistura de fases diferentes, essa concentração mínima de biossurfactante necessária para produzir a tensão superficial mínima na água e formar micelas é denominado de CMC-concentração micelar crítica. Eles podem atuar como agentes umidificantes, espumantes e solubilizantes em diferentes processos industriais. Em ambientes poluídos por óleo (sólidos ou líquidos), os bioemulsificantes podem aumentar a dispersão efetiva e a biodisponibilidade de poluentes hidrofóbicos para acesso e degradação microbiana pelo processo de solubilização de micelas. Eles têm a capacidade de mobilizar moléculas hidrofóbicas ligadas em substratos sólidos, aumentando a taxa de fluxo (MARTIN, 2006; PAREEK, 2011). Essas biomoléculas são, portanto, agentes adequados para diferentes tecnologias de biorremediação. De acordo com Willumsen e Karlson 1997, o uso de Bioemulsificante (Figura 8) se justifica não apenas em favor de sua capacidade de emulsificação, mas também por não serem tóxicos, não agredirem ao meio ambiente, apresentar boa tolerância térmica e de pH, força iônica, e adaptação a tipos variados de substratos renováveis (SALAM, 2011; SALES, 2017).

Figura 8 – Esquema da quebra da tensão superficial

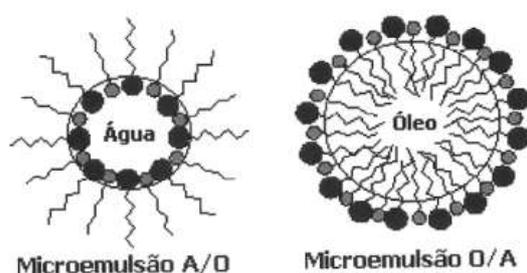


Fonte: <https://brasilecola.uol.com.br/quimica/ligacoes-hidrogenio.htm>. Acesso em: 20 fevereiro 2018

4.1.1 Emulsões

Emulsões são dispersões nas quais a fase dispersa é constituída por pequenas gotículas de líquido distribuídas em um veículo no qual são imiscíveis. São classificadas como Macro emulsões que apresentam tamanho das gotículas variando de 100 a 100.000 nm e micro emulsões (Figura 9).que apresentam tamanho das gotículas varia de 10 a 100 nm.

Figura 9 – Microemulsão água e óleo (A/O) e óleo e água (O/A)

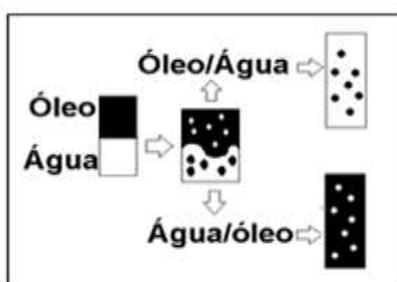


Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000100023. Acesso em: 18 Fevereiro 2018.

4.1.2 Tipos de emulsões água e óleo(A/O) e emulsões óleo e água (O/A)

As emulsões são sistemas bifásicos (Figura 10) constituídos por fases distintas, de acordo com seu comportamento de dispersão. As fases são denominadas de Dispersa (também conhecidas como fase interna ou descontínua) e dispergente (Fase externa ou contínua). Emulsões água em óleo (A/O) são denominadas de fase dispersa ou interna. As emulsões óleo em água (O/A) são denominada de fase interna ou dispersa.

Figura 10 – Emulsões tipo A/O e O/A



Alguns fatores podem influenciar fortemente na produção de bioemulsificante como Temperatura, pH, meio de produção, micro-organismo produtor e as condições submetidas ao longo de todo processo produtivo (BERGER, 2012).

4.1.3 Fontes alternativas para produção de bioemulsificante

Alguns trabalhos relatam a produção de bioemulsificantes por fungos. Na literatura quase toda a produção de emulsificantes esta associada à produção de biosurfactantes de origem bacteriana. Entretanto, são citados produção de biosurfactantes e bioemulsificantes por fungos a partir de substratos como manipueira, óleo de babaçu, óleo de milho; óleo de girassol, óleo de soja; óleo residual de refinaria. Apenas 1% dos relatos apresentam a produção de biosurfactantes e biomulsificantes por fungos envolvendo *Rhizopus arrhizus* e *C. elegans* entre os produtores de biosurfactantes (DECESARO; RIGON; THOMÉ *et al*, 2013).

4.1.4 Micro-organismos produtores de bioemulsificantes

Em geral os micro-organismos produtores de bioemulsificante (Tabela 1) são em grande maioria bactérias e fungos. Dos fungos relatados na literatura cita-se a ordem Mucorales representado pelo gênero *Rhizopus sp*, e a especie *Cunninghamella elegans* entre outros representantes. Há trabalhos relatados na bibliografia consultada que apresentam fungos como produtoras de biosurfactantes, com poucos relatos de produtores de bioemulsificantes (PELE, 2018).

Tabela 1 – Fungos produtores de bioemulsificantes.

Bioemulsificante - Bioemulsificantes de alto peso molecular			
Fungo	Bioemulsificante	Papel Fisiológico	Fonte
<i>Saccharomyces Cerevisae</i>	Mannoproteínas	Estimulação do sistema Imunológico. Emulsão	Casanova et al, 1992; Lukondeh et al, 2003
<i>Kluyveromyces</i>	Acido Urônico	Emulsificação e Desontoxicação de hidrocarbonetos	Martinez-Checa et al 2002; Jain et al, 2013.

Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4387539/table/T1/>. Acesso em: 18 janeiro 2018.

4.1.5 Biosurfactante e bioemulsificantes

A composição química de biosurfactantes e bioemulsificantes são diferentes, ambos são geralmente produtos microbianos. Os bioemulsificantes apresentam alto peso molecular ao passo que biosurfactantes possuem baixo peso molecular e são compostos por açúcares, aminoácidos, ácidos graxos e grupos funcionais, como os ácidos carboxílicos. Os biosurfactantes produzidos de forma associada ao crescimento (lipídios de trealose) conferem hidrofobicidade de superfície celular aumentada ao organismo produtor. A hidrofobicidade da superfície celular é essencial para facilitar o acesso e posterior absorção de substratos hidrofóbicos por células microbianas. Os glicolípidos (ramnolípidos, sophorolipídeos, trealose lípidos) consistem em diferentes açúcares ligados aos ácidos gordos β -hidroxi, enquanto os lipopéptidos (surfactina, iturina e fengicina) consistem em cicloheptapeptídeos com aminoácidos ligados a ácidos gordos de diferentes comprimentos de cadeia. Essas moléculas são de natureza anfifílica e esta propriedade permite dissolver em solventes tanto polares como não polares (CARDOSO, 2012).

5. SUBSTRATOS ALTERNATIVOS

5.1 Novos modelos econômicos e sustentáveis para a pesquisa científica

O cenário econômico mundial vive uma nova realidade, um período de transição por busca de novos modelos alternativos que estejam em harmonia com a sustentabilidade e, que possam coexistir no mesmo universo associando o desenvolvimento tecnológico. E, que o desenvolvimento tecnológico promova qualidade e ao mesmo tempo mantenha padrões de produção de forma equilibrada, respeitando os parâmetros de uma convivência harmoniosa (BERGER, 2012; CAMPOS TAKAKI, 2009). Para tal objetivo, tem havido uma busca de alternativas viáveis à economia e à ecologia por uso de substratos mais econômicos, acessíveis e ecologicamente corretos. Os substratos sintéticos são utilizados regularmente a muito tempo para cultivo de micro-organismos. São meios quimicamente definidos com concentração de aminoácidos, vitaminas e substâncias essenciais. Entretanto, o custo é alto, o que dificultado a acessibilidade e inviabiliza a pesquisa e muitas práticas laboratoriais (BERGER, 2013; NERES, 2018).

A necessidade por desenvolver novos meios e compostos que favoreçam a pesquisa vem surgindo dia a dia, na intenção de tornar mais acessível e ágil os procedimentos de produção de micro-organismo sem perda de qualidade. Nessa direção a busca por novos meios que possam ser capazes de substituir os meios sintéticos, com qualidade similar tem ocorrido com muita frequência (AMORIN *et al.*, 2006; STAMFORD *et al.*, 2007; KLEKAYAI & SUNTORNSUK, 2010; FAI *et al.*, 2011).

5.2 Relatos de casos com uso de substratos alternativos

A literatura relata uso de substratos alternativos, produzido a partir do bagaço de malte, resultante do processo inicial da fabricação de cervejas, e derivado do processo de obtenção do mosto, pela fervura do malte moído, que após filtração, resulta em um resíduo muito utilizado na alimentação animal relatado por Amorin (2005); Fakas (2007); (Berger et al, 2012) e (Pele et al, 2018)

Alguns substratos alternativos (milhocina; manipueira; etc) foram testados por vários autores (AMORIN *et al.*, 2006; STAMFORD *et al.*, 2007; ZAMANI *et al.*,

2007; KLEEKAYAI & SUNTORNSUK, 2010; LINS *et al.*, 2010; BERGER *et al.*, 2012).

Um trabalho que relata o uso de substratos alternativos foi descrito por FAI *et al.*, (2011) descreve o crescimento e produção de quitina e quitosana por *Mucor circinelloides*. Os autores relatam o rápido crescimento do fungo em 48h, com relevante produção de biomassa (20,7 g/L) após 72 h de cultivo. A maior produção de quitosana em 48h com *Mucor circinelloides* sugeriu durante 48h com pH entre 5 e 4 do meio de cultivo provavelmente favoreceu a atividade desta (AMORIN *et al.* 2005) que considerou o pH ótimo de 4,5 para a atividade da quitina desacetilase de *Zygomycetes* (BERGER *et al.*, 2012).

A necessidade de que a composição do meio de substrato alternativo apresente condições que favoreçam o desenvolvimento do micro-organismo à produção de biomassa, e de bioprodutos, poderá influenciar positivamente, num bom resultado. Os substratos alternativos e as condições de cultivo, associadas a alguns fatores poderão determinar a produção de bioprodutos como o tempo de incubação, o pH, a temperatura e a velocidade de agitação (POCHANAVANICH, SUNTORNSUK, 2002; CHATERJJE *et al.* 2005).

Evidenciam-se alguns substratos utilizados para composição de tais meios, como milhocina, resíduo da indústria de processamento do milho rico em aminoácido, vitaminas e minerais (CARDOSO, 2012); e a manipueira, produto obtido a partir do processamento da mandioca e produção de farinha, apresentam na composição potássio, nitrogênio, magnésio, fósforo, cálcio e enxofre. A composição rica em minerais e vitaminas também está associada ao bom desenvolvimento das culturas em meios alternativos (PONTE, 2006).

Muitos outros substratos utilizados na produção ou composição de meios como batata doce, mel de abelha e milho etc. mesmo apesar de relatar boa produção de bioprodutos, usados por alguns autores se tornaram inviáveis por não apresentarem as condições econômicas, ou concorrer com a indústria alimentícia (CARDOSO *et al.* 2012).

5.3 Tomate (*Solanum lycopersicum*) residual como substrato alternativo.

O tomate é uma das hortaliças mais abundante do mundo, superada apenas pela batata, com efetiva participação na dieta humana é considerado um edcelente

alimento funcional, o fruto é originário da América do Sul e apresenta importante frequência em todo o continente sul americano. Na Europa, foi utilizado primeiro como uma planta ornamental, mas, dada a importância desta cultura passou a ser cultivado em vários lugares naquele território. Em solo brasileiro, são cultivados em estufas e em solários. No mercado é assegurado a produtividade e o abastecimento durante todo ano. A produção do tomate é significativa em vários estados no Nordeste e no estado de Pernambuco. As condições para o uso do tomate na composição do meio de produção obedeceram algum critério característico como produto de descarte. O tomate (Tabela 2) é rico em minerais, tais como cálcio, ferro, fósforo, magnésio, sódio, zinco; rico em vitaminas do complexo B; vitamina D; vitamina K; possui importantes componentes em sua constituição como carboidratos, fibra alimentar, e proteína vegetal bem como licopeno e betacaroteno, que são importantes componentes na produção de meios alternativos. O conjunto dos componentes que integram o tomate, residual, (que é rica fonte de carboidratos, nitrogênio entre outros compostos) é objeto desse estudo (CARDOSO, 2012).

Até chegar ao consumidor final, o tomate é acondicionado e transportado, sofrendo os percaços que envolve o deslocamento e a logística comum aos centros comerciais, entretanto, há perdas significativa na quantidade e qualidade do produto ao longo de todo esse processo. Por ser descartada com facilidade e posuir importante composição nutricional, o tomate vem sendo objeto de estudo em função dessa alta capacidade alimentar e nutricional. FAKAS, S., PAPANIKOLAOU, S., GALIOTOU-PANAYOTOU, M., *et al* , 2008 desenvolveram pesquisas para a produção de meio de cultura com o tomate envolvendo micro- organismos. Essa pesquisa leva em conta a presença de vitaminas, carbono e nitrogênio peculiar desse fruto.

Tabela 2 – Composição química do tomate em 100g

Componentes	Unidade (g)
Água	9.452.00
Proteínas	0.88
Gorduras totais	0.2
Carboidratos	3.89
Fibra alimentar	1.2
Monossacarídeos	2.63
Valor energético (K/cal)	18
Minerais	Miligramas (mg)
Cálcio	9.452.00
Proteínas	0.88
Gorduras totais	0.2
Carboidratos	3.89
Fibra alimentar	1.2
Monossacarídeos	2.63
Valor energético (K/cal)	18
Sódio	5.0
Zinco	0.17
Vitaminas	Miligramas (mg)
Tiamina	0.037
Riboflavina	0.019
Niacina	0.594
Vitamina B6	0.08
Acido Fólico total	15
Vitamina E (alfatocoferol)	0.54
Vitamina K (filoquinona)	7.9
Lipídios	Gramas (g)
Gorduras saturadas	0.028
Gorduras moniinsaturadas	0.031
Gorduras poli-insaturadas	0.083

Fonte: <http://tabnut.dis.epm.br/alimento/11529/tomate-vermelho-maduro-cru>.
Acesso em: 20.01.2018.

5.4 O Melaço da cana-de-açúcar

O Brasil é um dos maiores produtores de cana de açúcar do mundo. A cana-de-açúcar destaca-se, entre as plantas cultivadas, no nordeste do Brasil e no estado de Pernambuco e contribui para a produção de recursos energéticos de uso alimentar humano, como açúcar, rapadura, e melaço de cana-de-açúcar. A cana-de-açúcar é um importante vegetal, vem sendo utilizada na produção de biocombustível como alternativa renovável, em face da escassez do petróleo e derivados. O melaço (Tabela 3). é o líquido que se tem como resíduo de fabricação do açúcar cristalizado, a presença de quantidade relativas de carboidratos, Nitrogênio e proteínas vegeais torna esse produto, qualificado para a formuação de meios alternativos e pode contribuir para o crescimento de micro-organismos utilizado no processo. (OMETTO, 2000).

Tabela 3 – Composição química do melaço.

Componentes	%
Água	15-20
Matéria orgânica	74
Substâncias redutoras totais	46-72
Substâncias redutoras livres	0,2-1,2
Sacarose	30-40
Glicose	14
Frutose	16
Substâncias redutoras não fermentáveis	2-4
Nitrogênio total	0,51
Proteína kjdahl	3,2
Não açucares orgânicos	9-12
Cinzas	8-11

Fonte: <https://www.slideshare.net/andersonformiga3/rum-63233145>.
Acesso em: 19 março 2018

5.5 Resíduo de Malte

O malte tem histórico de cultivo há mais de 8 mil anos, é resultante do processo artificial e controlado de germinação (malteação) da cevada, cereal da família das gramíneas (*gênero Hordeum*). O malte (Tabela 4) reúne características que justificam seu uso é rico em amido, possui enzimas, e uma casca que confere proteção ao grão durante a malteação e dá o aroma e sabor característicos. O grão com defeito ou com casca danificada, é desprezado no processo de seleção para a Malteação (BRASIL, 2012). A presença de carboidratos e de proteínas abundantes na composição dos grãos é fator que habilita sua incersão como componente relevante em diversas bebidas e o torna cada vez mais objeto de pesquisa na formulação de meios alternativos.

Tabela 4 – Composição química do grão da Cevada

Nutriente	Concentração
Matéria Seca	89,0%
Proteína Bruta	7 – 13%
Proteína degradável no rúmen (% da PB)	75,0%
Proteína não degradável no rúmen (% da PB)	25,0%
Proteína Solúvel (% da PB)	20,0%
Fibra Bruta	6,0%
Fibra detergente ácido (FDA)	7,0%
Fibra detergente neutro (FDN)	19 - 25%
Fibra detergente neutro-efetiva (% da FDN)	50,0%
Carboidratos não estruturais	56,0%
- 9,1% açúcares	—
- 81,7% amido	—
- 9,2% pectina e b-Glucans	—
Extrato etéreo	2,2%
Cinzas	2,6%
Cálcio	0,1%
Fósforo	0,4%

Fontes: Hoard's Dairyman Feeding Guide, 1998. From Feed to Milk, Penn state University
 acesso 19/01/2018

5.6 Desenvolvimento tecnológico sustentável e resíduos de baixo custo

A necessidade por desenvolver novos meios e compostos que favoreçam a pesquisa vem surgindo dia a dia, na intenção de tornar mais acessível e ágil os procedimentos de produção de micro-organismo sem perda de qualidade. Nessa direção a busca por novos meios que possam ser capazes de substituir os meios sintéticos, com qualidade similar tem ocorrido com muita frequência (AMORIN *et al.*, 2006; STAMFORD *et al.*, 2007; KLEKAYAI & SUNTORNSUK, 2010; FAI *et al.*, 2011).

Um relato de uso de resíduo agroindustrial, produzido a partir do bagaço de malte, resultante do processo inicial da fabricação de cervejas, e derivado do processo de obtenção do mosto, pela fervura do malte moído, que após filtração, resulta em um resíduo muito utilizado na alimentação animal relatado por Lima (2001).

6. FUNGOS

Os fungos são utilizados em muitos processos biotecnológicos, tais como a produção de quitina e quitosana, bioemulsificantes, enzimas, vitaminas, polissacáridos, lípideos, pigmentos e outros processos de produção de alimentos. Biomoléculas como, surfactantes e biosurfactantes são produzidas comercialmente, e têm sido reportadas como potencialmente valiosos na área da biotecnologia, insumos de alto valor agregado (KUO; TSAI, 2010; PAREEK *et al.*, 2011; SALAM *et al.*, 2011; ABU-ELREESH; ABD-EL-HALEEM, 2014; PEREIRA *et al.* 2017; COSTA, 2017; NERES, 2018). Além disso, metabolicamente inativa, a biomassa fúngica morta, também apresenta outras aplicações diretas devido à sua composição química única, sequestra ions metálicos e complexos metálicos de soluções (ABU-ELREESH; ABD-EL-HALEEM, 2014).

A capacidade adsortiva, e o potencial da biomassa fúngica podem ser utilizados no combate a poluição de mares rios e afluentes. A capacidade quelantes permite seu emprego na remoção de metais pesados; no tratamento de efluentes; na agricultura; como fungicida; como aditivos alimentares; materiais biomédicos; na medicina e odontologia; na indústria farmacêutica; em cromatografia; na preparação de colunas; na imobilização de enzimas, etc. (ANDRADE *et al.*, 2003; SHINYA, 2017).

6.1 *Zigomyceto*

Os *Zigomycetos* fazem parte de um grupo de fungos filamentosos do filo *Zygomycota*, apresentam parede celular constituída por quitina e quitosana, e micélio geralmente cenocítico, com septos apenas na delimitação dos órgãos de reprodução. A taxonomia dos *Zigomycetos* é baseada no tipo de vida de seus representantes que podem ser parasita, sapróbio, ou mutualista e também em características morfológicas de suas estruturas de reprodução assexuada (PELE *et al.*, 2018).

6.2 Mucorales

Mucorales é a ordem com aproximadamente trezentas espécies, são fungos que colonizam rapidamente um substrato, crescem de forma exuberante, com micélio denso e conspícuo, podem atingir até três centímetros de altura (FAKAS, 2007; FAI, 2011). A família Mucoraceae é a mais numerosa das famílias da ordem Mucorales, estando representada por vinte gêneros e cerca de cento e trinta espécies, que são caracterizadas pela formação de esporângios multi- esporulados, com columela bem desenvolvida, podendo apresentar espinhos e outros tipos de projeções. Os representantes mais comuns pertencem aos gêneros *Rhizopus*, *Actinomucor*, *Mucor*, *Rhizomucor* e *Zygorhynchus* (PELE et al, 2018).

6.3 Gênero *Rhizopus*

É um sapróbio parasita facultativo de vegetais, fezes de animais, pães velhos, matéria orgânica em decomposição, encontrado no solo. As espécies de *Rhizopus* (Figura 11) produzem esporos e se reproduzem sexualmente assexuadamente. A reprodução assexuada ocorre a partir da produção de esporangiosporos, derivados do interior do esporângio, uma estrutura no formato da cabeça de um alfinete.

Figura 11 – *Rhizopus* sp



Fonte: <https://visualsunlimited.photoshelter.com/image/I0000C6L.I9vMYMo>. Acesso em: 18 Fevereiro 2018.

6.4 *Rhizopus microsporus*

Rhizopus microsporus é um fungo de solo amplamente distribuído que pode causar mucormicose ou Zigomicose em humanos imunocomprometidos e requeima de plântulas em arroz, e cabeça da flor de girassol. É um dos poucos fungos que abrigam endossimbiontes bacterianas, possui quitina em sua parede celular e apresenta importante crescimento quando em condições favoráveis ao seu desenvolvimento (PELE et al., 2018).

O gênero *Rhizopus* compreende dezoito espécies das quais se destacam *R. caespitosus*, *R. delemar*, *R. homothallicus*, *R. microsporus*, *R. arrhizus*, *R. oryzae*, *R. reflexus*, *R. Schipperae* e *R. Stolonifer*. Esse número foi confirmado a partir de Um estudo filogenético molecular de análise do gênero. O gênero *Rhizopus*, é formado por sapróbios parasita facultativo de frutas estragadas, pães velhos, vegetais maduros, encontrado geralmente em fezes de animais no solo. As espécies de *Rhizopus* produzem esporos e se reproduzem sexualmente e assexuadamente.

A reprodução assexuada ocorre à produção de esporangiosporos, derivados do interior do esporângio, uma estrutura no formato da cabeça de um alfinete (KLEEKAYAI, 2010; POCHANAVANICH, 2002).

REFERÊNCIAS

- 1 ABU-ELREESH, G. M.; ABD-EL-HALEEM, D. A. Biodiesel, bioflocculant and biosorbent from the fungal *Curvularia* sp. strain DFH1. **European Journal of Experimental Biology**, v. 4, n. 1, p. 218-226, 2014.
- 2 AMORIN, R. V. S.; SOUZA, W.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Faster Chitosan Production by Mucoralean Strains in Submerged Culture. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.20-23, 2001.
- 3 AMORIN, R.V.S.; LEDINGHAM, W.M.; FUKUSHIMA, E.K.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Screening of chitin deacetylase from Mucoralean strains (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.31, p. 19-23, 2005.
- 4 AMORIN, R.V.S.; PEDROSA, R.P.; KAZUTAKA, F. et al. Alternative carbon sources from sugar cane process for submerged cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to produce chitosan. **Food Technology and Biotechnology**, v.44, p. 519-523, 2006.
- 5 ANDRADE, V. S.; BARROS, N. B., FUKUSHIMA K. et al. Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570) – A factorial study. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 20, p.149-153, 2003.
- 6 ANDRADE, V.S.; NETO, B.B; SOUZA W., CAMPOS-TAKAKI, G.M. A factorial design analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.46, p.1042-1045, 2000.
- 7 BERGER, L. R. R.; CAVALCANTE, H. M. M.; STAMFORD, T. C. M. et al. Chitin and chitosan produced by *Cunninghamella elegans* using alternative medium–coconut water. In: **Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges**. Mendez-Vilas, A. ed., Publisher: World Scientific Co. Pte. Ltd., p. 377-39, 2012.
- 8 CAMPOS-TAKAKI, G. M.; DIETRICH, S. M. Characterization of Cell Walls from Mucoralean Fungi by Biochemical Composition, Transmission Electron Microscopy. In: **Cur. Res. Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. A. Mendez-Vilas (Org.), World Scientific Publishing Company Pte Ltd, v. 01, p. 569-573, 2009.
- 9 CARDOSO, A.; LINS, C. I. M.; SANTOS, E. R. et al. Microbial Enhance of Chitosan Production by *Rhizopus arrhizus* Using Agroindustrial Substrates. **Molecules**, v. 17, p. 4904-4914, 2012.
- 10 DECESARO, A.; RIGON, M. R.; THOMÉ, A. et al. Produção de biossurfactantes por micro-organismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. **Quím. Nova**. v. 36. n.7. São Paulo, 2013.

- 11 FAI, A. E. C.; STAMFORD, T C. M.; STAMFORD-ARNAUD, T. M. *et al.* Physico-Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitin and Chitosan Produced by *Mucor circinelloides* Using Yam Bean as Substrate. **Molecules**, v. 16, p. 7143-7154, 2011.
- 12 FAKAS, S., CERTIK, M., PAPANIKOLAOU, S., *et al.* Alfa -linolenic acid production by *Cunninghamella echinulata* growing on complex organic nitrogen sources. **Bioresour Technol.** 99, 5986–5990, 2007.
- 13 FAKAS, S., PAPANIKOLAOU, S., GALIOTOU-PANAYOTOU, M., *et al.* Organic nitrogen of tomato waste hydrolysate enhances glucose uptake and lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata*. **Journal of Applied Microbiology**, 105:1062–1070. 2008.
- 14 FRANCO, L. O.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P. *et al.* *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. **Revista Analytica**, v. 4, n. 14, p. 40-44, 2005.
- 15 HESSELTINE, C. W.; ANDERSON, R. F. Microbiological production of carotenoids. I. Zygosporos and carotene produced by interspecific and crosses of Choanephoraceae in liquid media. **Mycology**. 1957.
- 16 HIRANO, S. **Chitin and Chitosan**. New York: Elsevier, 1989, p. 37-43.
- 17 JIN HU, KE; KWOK-WING YEUNG; KWOK-PING HO and JIN-LIAN HU. Rapid extraction of high-quality chitosan from mycelia of *Absidia glauca*. **Journal of food Biochemistry** 23, 1999, p. 187-196.
- 18 KLEEKAYAI, T.; SUNTORNSUK, W. Production and characterization of chitosan obtained from *Rhizopus oryzae* grown on potato chip processing waste. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2010, DOI 10.1007/s11274-010-0561-x.
- 19 KUO, Y. C., TSAI, Y. T. Chitosan Nanofiber. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 3, p. 731-739, 2010.
- 20 LEIVA-CANDIA, D.E. *et al.*, The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. **Fuel**, v.123, n.1, p. 33-42, 2014.
- 21 LINS, C.I.M.; CARDOSO A.; SILVA, M.C.F.; BATISTA, A.C L.; JARA, A.M. A.T.; BERGER, L.R.R.; SANTOS, E.R.; MARQUES DA SILVA, A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Evaluation of chitin and chitosan by different extraction methods from mucoraleanfungi biomass. **Asian Chitin Journal**, v. 6, n. 2, 2010.
- 22 MARTIN, C. *et al.*, Characterisation of Agricultural and Agro-Industrial Residues as Raw Materials for Ethanol Production. **Chem. Biochem. Eng. Q.**, v.20, n.4, p. 443-447, 2006.

- 23 NEOH, C.H. et al., Utilization of Agro-Industrial Residues from Palm Oil Industry for Production of Lignocellulolytic Enzymes by *Curvularia clavata*. **Waste Biomass Valor**, v.6, p. 385-390, 2015.
- 24 OMETTO, A. R. **Discussão sobre os fatores ambientais impactados pelo setor sucroalcooleiro e a certificação socioambiental**. São Carlos, SP (dissertação) Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, 2000.
- 25 PANDEY, A. et al., Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.
- 26 PANESAR, P.S.; KAUR, S. Bioutilisation of agro-industrial waste for lactic acid production. **Food Science + technology**, v. 50, n. 10, p. 2143-2151, 2015.
- 27 PAREEK, N.; VIVEKANAND, V.; DWIVEDI, P. et al. *Penicillium oxalicum* SAEM-51: a mutagenised strain for enhanced production of chitin deacetylase for bioconversion to chitosan. **New Biotechnology**, v. 28, n. 2, 2011.
- 28 PELE, M. A., MONTERO-RODRIGUEZ, D., RUBIO-RIBEAUX, D. et al. **Development and improved selected markers to biosurfactant and bioemulsifier production by *Rhizopus* strains isolated from Caatinga soil**, 17(6), 150–157. 2018.
- 29 POCHANAVANICH, P.; SUNTORNSUK, W. Fungal chitosan production and its characterization. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 17-21, 2002.
- 30 PEREIRA, J. et al., Agricultural and agro-industrial residues-to-energy: Techno-economic and environmental assessment in Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v.81, p.521-533, 2015.
- 31 SALAM, M. A.; MAKKI, M. S. I.; ABDELAAL, M.Y.A. Preparation and characterization of multi-walled carbon nanotubes/chitosan nanocomposite and its application for the removal of heavy metals from aqueous solution. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 509, p. 2582–2587, 2011.
- 32 SALES, P.S.C. et al., Produção de lipase por *Cunninghamella echiculata* (UCP 1308) através de fermentação submersa utilizando diferentes meios de produção **ENGEVISTA**, v. 19, n.5, p. 1340-1351, 2017.
- 33 SINDHU, R. et al., Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products – An overview. **Renewable Energy**, v.98, p.203- 215, 2016.
- 34 STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M.; FRANCO, L. O. Produção, propriedades e aplicações da quitosana na agricultura e no ambiente. Cap. 21 p 487-506. In: **Micro-organismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura** 259, 2012.

- 35 WU, F. C.; TSENG, R. L.; JUANG, R. S. A review and experimental verification of using chitosan and its derivatives as adsorbents for selected heavy metals. **Journal of Environmental Management**, v. 91, p. 798-806, 2010.
- 36 YANG, L.Y.; ZHANG, J. L.; BASSETT, C. L. *et al.* Difference between chitosan and oligochitosan in growth of *Monilinia fructicola* and control of brown rot in peach fruit. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, p. 254.
- 37 ZAMANI, A.; EDEBO, L.; SJÖSTRÖM, B.; TAHERZADEH, M. J. Extraction and Precipitation of Chitosan from Cell Wall of Zygomycetes Fungi by Dilute Sulfuric Acid. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 3786–3790, 2007.

CAPÍTULO II

BIOCONVERSÃO DE RESÍDUOS AGRO-INDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO
SIMULTÂNEA DE QUITOSANA E BIOEMULSIFICANTE POR *RHIZHOPUS*
MICROSPORUS UCP 1304

Artigo submetido para **Acta Scientiarum Technology**. Através da interface de
administração do sistema em 19 de junho de 2018.

**BIOCONVERSÃO DE RESÍDUOS AGRO-INDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO
SIMULTÂNEA DE CHITOSAN E BIOEMULSIFICADOR PELO *RHIZOPUS
MICROSPORUS UCP 1304***

Josué Félix de Araújo¹; Rafael Kabroski Antunes¹; Rosileide Fontenele da S. Andrade²;
Carlos Alberto Alves da Silva³

1 - Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais Bolsista FACEPE; 2- Bolsista de Pós Doutorado (CNPq-FACEPE) - 3 -Pesquisador do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) – Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) – Rua do Príncipe, 526, Boa Vista, Recife- Pernambuco, 50050-900.

RESUMO. A transformação de fontes naturais renováveis como tecnologia para obtenção de novos bioprodutos por micro-organismos tem sido alvo de intensas pesquisas no sentido de formular novos meios de produção. Neste trabalho foi investigado a produção simultaneamente de quitosana e bioemulsificante, a partir do cultivo de *Rhizopus microsporus* UCP 1304 em meio contendo resíduos agroindustriais. O cultivo foi realizado em frascos de Erlenmeyer contendo 100mL do meio com melaço (4%), bagaço de malte (1,4%) e caldo de tomate(0,03%), sendo inoculado 5% da suspensão esporíca (10^7 esporangiosporos/mL) 28°C, 140 rpm por 96h. Após este período, a biomassa foi separada do líquido metabólico, liofilizada e o rendimento determinado por gravimetria. Um planejamento fatorial 2^2 variando agitação e temperatura foi realizado para avaliar o melhor rendimento de biomassa e quitosana, obtido na condição 4 (agitação de 150rpm e temperatura de 35°C). De acordo com os dados obtidos *Rhizopus microsporus*, foi capaz de biotransformar resíduos agroindustriais, com melhor rendimento em biomassa de 12,6 g/L, quitina 485,71mg/g e quitosana 150mg/g de biomassa. O bioemulsificante (4,8 g/L) detectado, nessa condição, se apresentou como agente redutor da viscosidade do óleo queimado de motor de 150Cp para 70Cp de petroderivados, com redução da tensão superficial de 43,5 mN/m, mantendo estabilidade após adição de até 15% de NaCl em pH ácido e alcalino.

Palavras-Chave: Fungos Mucorales, substratos alternativos, Biopolímeros, Bioemulsificante.

1. INTRODUÇÃO

O uso eficiente de fontes renováveis para obter novos bioprodutos tem sido um dos requisitos fundamentais para uma economia sustentável. Deste modo, o interesse por fontes naturais e renováveis normalmente descartadas e sendo chamadas de resíduos agroindustriais, vem aumentando no âmbito da sustentabilidade industrial e ambiental, devido aos altos custos da utilização dos reagentes componentes principais dos meios de produção. Algumas espécies de micro-organismos são capazes de biotransformar diferentes tipos de resíduos, ricos em nutrientes. Pesquisas destacam resíduos de tomate (rico em carboidratos e carotenoides como o licopeno), melação (resíduo rico em carboidratos) e bagaço de malte (rico em proteínas) para produção de diversos bioprodutos de interesse industrial (Fakas et al. 2007; Andrade et al., 2015; Gupta & Prakash, 2015; Daylin et al., 2017; PELE, 2018).

Rhizopus é um fungo filamentosos pertencente ordem Mucorales, amplamente encontrado no solo. Dentre os bioprodutos obtidos a partir de fungos filamentosos, e que são de interesse industrial, estão a quitosana e os bioemulsificantes (Paul, Clark, 1989; Pele et al., 2018).

A quitosana é um biopolímero constituído por um polissacarídeo provenientes da desacetilação da quitina, obtida da carapaça de caranguejo e camarão. Brar Kaur, Dhillon, & Soccol, 2014, e da parede celular de inúmeros fungos filamentosos (Cardoso, Lins, Dos Santos, Silva, & Campos-Takaki, 2012). Estruturalmente, a quitosana é um heteropolímero composto por ligação $\beta(1\rightarrow4)$ de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina formada através da desacetilação parcial da quitina (Zargar, Asghari, & Dashti, 2015).

A obtenção de quitosana a partir de fungos filamentosos oferece diversas vantagens em relação à quitosana obtida a partir de crustáceos, principalmente por evitar reações alérgicas possíveis a proteínas de crustáceos, ser biodegradável, biocompatível e poder ser produzida a partir de fontes naturais e renováveis (Leite et al., 2015).

Por outro lado, os bioemulsificantes são biomoléculas anfipáticas que podem ser produzidas extracelularmente por fungos filamentosos, é biodegradável, possuem funcionalidade sob condições extremas de pH, salinidade e temperatura, e ainda quando aplicado em produtos industriais são responsáveis pela formação e estabilização de emulsões entre líquidos com polaridade diferentes (Fracchia et al, 2012).

Uma variedade de micro-organismos são capazes de sintetizar bioemulsificantes (Souza et al., 2016) Dentre os fungos filamentosos, espécies de *Rhizopus* sp tem sido pouco destacadas para produção de bioemulsificante (Pele et al., 2018).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi propor a utilização de meio de produção formulado a partir de resíduos agroindustriais (tomate, bagaço de malte e melaço) como substratos alternativos, usando planejamento fatorial, na produção simultânea de quitosana e bioemulsificante, pela amostra de *Rhizopus microsporus* através da fermentação submersa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo

Foi utilizado neste estudo *Rhizopus microsporus* UCP 1304, pertencente a Coleção de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco-UCP, registrada no World Federation for Culture Collection-WFCC. O fungo foi mantido em meio de Batata Dextrose Agar (BDA) composto por extrato de batata (20g/L), Dextrose 15g/L, Ágar 15g/L em pH 5.6, e temperatura 28°C.

2.2 Substratos

Os substratos utilizados para formulação do meio alternativo foram o tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) coletado no mercado informal de feiras livres, Recife-Pernambuco; melaço, descarte da produção de açúcar de uma indústria canavieira localizada na zona rural do Recife-PE e bagaço de malte (descarte das indústrias de cerveja), localizadas na região metropolitana do Recife-PE. Todos os substratos foram acondicionados e mantidos sob refrigeração.

2.3 Condições e preparação do meio de produção

2.3.1 Preparo do meio de produção

Os tomates, foram lavados em água corrente até remoção total das sujidades, mantidos em temperatura ambiente 28°C, a seguir foram pesados. O preparo do caldo foi realizado pelo método descrito por (Fakas et al, 2007). Inicialmente, 1kg de tomate foi triturados em liquidificador, (velocidade máxima) até completar a homogeneização com o volume para 3L com água destilada. Os principais nutrientes deste meio estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Composição dos principais compostos presentes no meio de produção

*TOMATE AMADURECIDO (100g)	
COMPOSTOS	QUANTIDADE (mg)
Licopeno	227
Vitamina A (betacaroteno)	105
Vitamina B1 (Tiamina)	0,08
Vitamina B2 (Riboflavina)	0,05
Vitamina B3 (Ácido pantatênico)	750
Vitamina B5 (Niacina)	0,9
Vitamina C (tiamina)	40
Vitamina E (Alfa tocoferol)	120

**MELAÇO DA CANA DE ÁCUCAR	
COMPOSTOS	QUANTIDADE (%)
Glicídios redutores em glicose	14,72%
Glicídios não redutores em sacarose	33,78

*** BAGAÇO DE MALTE	
COMPOSTOS	QUANTIDADE (%)
Carboidratos (em amido)	64,21
Lipídeos	2,24
Proteínas	9,15

Fonte: * EMBRAPA (2006)

** FELTRIN (2000)

*** VENTURINI-FILHO et al (1999)

2.4 O inóculo

Esporos de *Rhizopus microsporus* crescidos durante 48h foram transferidos para placas de Petri contendo o meio Sabouraud, durante 48h, mantida a 28°C. Em seguida, os esporangiosporos jovens foram coletados e transferidos para água destilada 50mL até a obtenção de 10^7 esporos/mL, contados em câmara de Neubauer, esta suspensão foi utilizada como inóculo.

2.5 Fermentação submersa

O meio de produção foi constituído por substratos alternativos contendo melaço (4%), bagaço de malte (1,4%) e caldo de tomate (0,03%). Os experimentos foram realizados utilizando frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio de produção e 5% do inóculo contendo 10^7 esporos/mL. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital 140rpm, durante 96 horas à temperatura de 28 °C, em fermentação submersa, conforme planejamento fatorial.

2.6 Determinação do rendimento de biomassa e separação do líquido metabólico, livre de células

Após o cultivo com *Rhizopus microsporus* no meio de produção, seguindo o planejamento fatorial, o líquido metabólico livre de células foi submetido à filtração utilizando tecido de Nylon, e armazenado para pesquisa do bioemulsificante. A biomassa foi lavada duas vezes com água destilada, e em seguida foi realizada a liofilização da amostra. O rendimento foi determinado por gravimetria e os resultados expressos em g/L.

2.7 Extração da quitina e quitosana a partir da biomassa

A quitina e quitosana foram extraídas a partir da massa micelial liofilizada da amostra do fungo de acordo com o método descrito por Jin Hu et al (1999). O processo envolve desproteinização da biomassa liofilizada com uma solução de NaOH a 1M na proporção de 1:30 (p/v), em seguida de autoclavagem (100 °C, 15 min). A separação da fração alcali insolúvel foi feita por centrifugação à 4000 rpm, durante 15 minutos. O resíduo obtido foi lavado com água destilada até pH 7,0 e submetido à hidrólise ácida usando ácido acético 2% (v/v) na proporção 1:40 (p/v), Em seguida a solução ácida solúvel autoclavada a 100 °C, por 20 minutos, logo após a solução foi separada por centrifugação à 4000 rpm durante 15 minutos, o precipitado corresponde a quitina, o sobrenadante foi reservado para extração de quitosana. O precipitado foi submetido a lavagem com água Milli-Q[®] e acetona até pH próximo a neutralidade a quitina obtida foi liofilizada. Em seguida o pH do sobrenadante, foi ajustado até pH 10, com solução de NaOH 1M. A solução foi mantida a 4°C “over night” e centrifugada (4000 rpm, 15 min) a quitosana obtida foi liofilizada.

2.8 Detecção da produção de bioemulsificante

2.8.1 Determinação da tensão superficial-TS

A tensão superficial foi mensurada em tensiômetro automático (modelo Sigma 70-KSV Ltd., Finland) através da imersão do anel de DU NUOY no líquido metabólico, registrando a força necessária para retirá-lo através da interface ar-líquido, de acordo com a metodologia de Kuyukina *et al* (2001).

2.8.2 Índice de emulsificação (IE 24)

A determinação do índice de emulsificação foi realizada de acordo com método descrito por Cooper e Goldenberg (1987). Em tubos graduados foram adicionados 1 mL do líquido metabólico, 1 mL de óleo queimado de motor, e demais óleos testados (soja pós-fritura e óleo de soja *in natura*). A mistura foi agitada em vórtex durante um minuto, em temperatura ambiente de 26°C. Após 24 horas de repouso e as medições foram realizadas através da equação:

$$E_{24} (\%) = \frac{He}{Ht} \times 100$$

He = altura da emulsão; Ht = altura total da mistura. As emulsões formadas foram medidas e os resultados expressos em porcentagem (Liu et al., 2013).

2.9 Planejamento fatorial

Os efeitos e as principais interações entre fatores físicos (temperatura e agitação) na produção de biomassa, quitosana e bioemulsificante por *Rhizopus microsporus* foi investigado utilizando um planejamento fatorial completo de 2² como ferramenta estatística. Os resultados foram avaliados pelo software STATISTICA versão 6.0 da StatSoft®. A matriz codificada do planejamento está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 – Matriz do planejamento fatorial de 2²

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	28	31.5	35
Agitação (rpm)	140	145	150

2.10 Extração do bioemulsificante

A partir da condição selecionada do planejamento fatorial, foi realizada a extração do bioemulsificante utilizando etanol 70% em uma proporção de 1:2 (BUENO *et al.*, 2010). O material foi deixado em repouso em over-night à 5°C. Após esse período o sobrenadante foi centrifugado a 4000 rpm, 15 minutos e o bioemulsificante extraído foi submetido a liofilização e o rendimento expresso em g/L.

2.11 Estabilidade do bioemulsificante avaliado pela viscosidade

O bioemulsificante foi submetido a diferentes variações de temperaturas (0 – 120°C), pH (2 – 12) e concentrações de NaCl (2 – 12%). Em seguida, no Bioemulsificante, foi realizada a análise da viscosidade com o objetivo de identificar a estabilidade térmica, iônica, e do pH, capaz de influenciar na viscosidade do óleo queimado de motor. Os resultados foram expressos em centipoise (Cp) para expressar os resultados da estabilidade medidos no viscosímetro

2.12 Caracterização físico-química do bioemulsificante na viscosidade de petroderivado

O efeito do bioemulsificante na viscosidade do óleo de motor queimado foi investigado através da adição de 6 mL em tubos graduados de do óleo de motor queimado e 2 mL contendo o bioemulsificante. Posteriormente, os tubos foram agitados em vórtex durante 1-2 minutos e as viscosidades medidas a 27 °C em viscosímetro automático (Brookfield (Middleboro, MA, USA; TC 500) utilizando o spindel nº51. Os resultados de viscosidade obtidos foram expressos em cP (LINS et al. 2012).

2.13 Avaliação do potencial de dispersão de óleo queimado de motor em água

A avaliação do potencial de dispersão de óleo queimado de motor, pelo bioemulsificante, foi investigada seguindo a metodologia descrita por Morikawa et al. (1993). O aparecimento de uma zona clara após a adição do líquido metabólico contendo o bioemulsificante, indicava a capacidade dispersante do bioemulsificante. O diâmetro da zona clara foi medido como área de deslocamento de óleo (ODA) e os resultados expressos em cm¹.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de biomassa por *Rhizopus microsporus* a partir da biotransformação do bagaço de malte, melão e caldo de tomate

Rhizopus microsporus foi cultivado em meio, com substratos alternativos, contendo melão (4%), bagaço de malte (1,4%) e caldo de tomate (0,03%) como nutrientes, e foi capaz de biotransformar esses resíduos em elevada quantidade de massa micelial obtendo um

rendimento de 12,6 g/L. A partir da análise elementar do meio testado, no laboratório de química da UFPE, a razão carbono/nitrogênio (C:N) obtida foi de 8:1. A partir desse experimento, foi possível sugerir que este meio constituído por substratos alternativos possui elementos essenciais que estimulam o crescimento de micro-organismos e a produção de diversos metabólitos secundários, especialmente pela presença dos carboidratos, lipídeos, proteínas e vitaminas presentes na sua composição (Monteiro, et al, 2004) (Tabela 1).

É possível indicar que existe uma relevante habilidade da amostra de *Rhizopus microsporus* no processo de biotransformação de substratos alternativos como fontes para seu crescimento celular, uma vez que Chuppa-Tostain, et al (2018) obtiveram rendimento inferior (8,5 g/L de biomassa) após cultivo de *Aspergillus niger* em meio contendo glicose como única fonte de carbono. Por outro lado, Monteiro, 2004; DENARDI-SOUZA et al 2018, utilizaram resíduo da produção de amido de trigo e obtiveram 9,5g/L de biomassa seca por *Rhizopus oryzae*, o que ainda é um valor de rendimento de biomassa inferior ao obtido neste estudo. Em outros trabalhos (Jin Hu et al. 1998; Maimbolwa et al., 2000) também foram obtidos valores inferiores de rendimento de 6g/L após cultivo de *Aspergillus oryzae* em meio contendo efluente da produção de amido de milho e trigo e 5g/L de biomassa após cultivo de *Rhizopus oligosporus* em um meio contendo águas residuárias de amido, respectivamente.

3.2 Produção biotecnológica de quitina e quitosana por *Rhizopus microsporus*, em meio contendo bagaço de malte, melão e tomate

A partir da biomassa produzida por *Rhizopus microsporus* em meio contendo substratos alternativos, foi realizada a extração de 485,71mg/g de quitina e 150mg/g de quitosana. Os resultados obtidos neste trabalho, representam uma importante melhoria na produtividade de quitosana por fungos filamentosos obtida em meios com substratos alternativos, após ser comparado aos rendimentos mais recentes obtidos pela literatura (Tabela 3).

Tabela 3 – Produção de quitina e quitosana por *Rhizopus microsporus* UCP 1304) em meio contendo caldo de tomate (0,03%), melão e bagaço de malte comparados com os registros da literatura

Micro-organismos	Substratos utilizados	Quitina (mg/g)	Quitosana (mg/g)	Referências
<i>Rhizopus microsporus</i>	Tomate, melão, bagaço de malte	485,71	150	Esse estudo
<i>Aspergillus niger</i>	Meio Batata Dextrose Agar	-	17,1	Afroz et al (2017)
<i>Cunninghamella elegans</i>	Milhocina, sacarose	5,4	2,4	Santos (2013)
<i>Aspergillus niger</i>	Glicose	10,5	1,9	Logesh et al. (2012)
<i>Gorgronella butleri</i>	Bagaço de maçã	4,3	1,1	Streit et al. (2004)
<i>Aspergillus niger</i> TISTR3245	Meio Batata Dextrose Agar	107	11	Pochanvanic; Suntornsuk (2002)

3.3 Influência da agitação e temperatura na obtenção do rendimento de biomassa, quitina e quitosana por *Rhizopus microsporus*

A partir do rendimento de biomassa, quitina e quitosana obtida pelo *Rhizopus microsporus* em meio contendo substratos alternativos foi realizado um planejamento fatorial variando os parâmetros físicos (temperatura e agitação) com o objetivo de induzir ao máximo a produção destes bioprodutos.

De acordo com os resultados obtidos, a máxima produção de biomassa (12,6 g/L), de quitina (483,20mg/g de biomassa) e de quitosana (150mg/g de biomassa) ocorreram na condição 4 do planejamento, respectivamente (Tabela 4) que contém parâmetros diferentes das condições inicialmente estudadas neste trabalho, destacando a temperatura (35°C), e agitação (150rpm) como relevantes neste trabalho para obtenção dos resultados. Esses resultados demonstram que a alteração da temperatura para valor mais elevado (35°C) e a agitação para valor mais alto (150rpm) inicialmente não investigados neste trabalho, favoreceram o aumento da produção de biomassa, dos biopolímeros quitina e quitosana por *Rhizopus microsporus*.

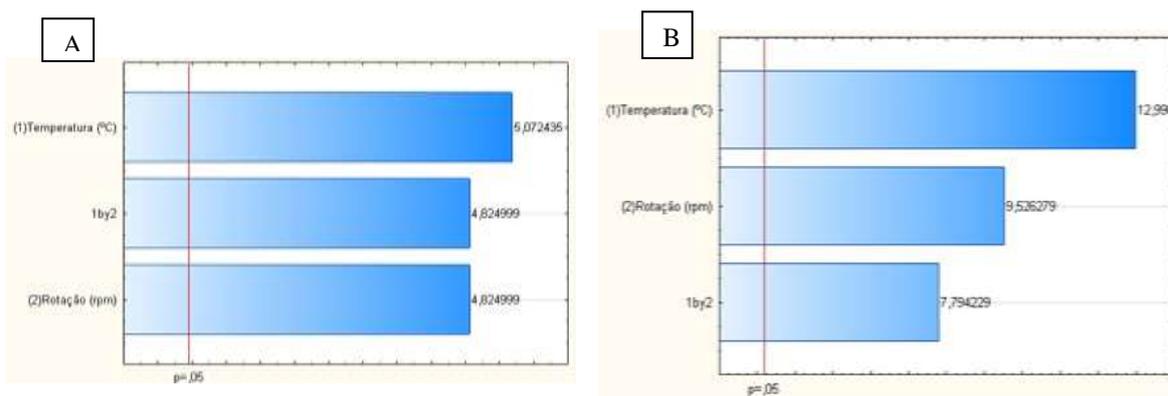
Tabela 4 – Efeito da temperatura e agitação na produção de biomassa, quitina e quitosana por *Rhizopus microsporus* de acordo com a matriz decodificada do planejamento experimental de 2^2

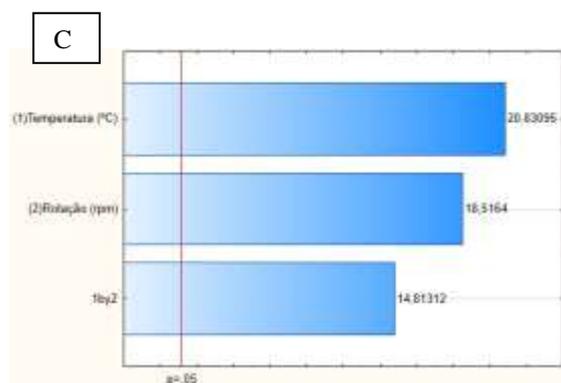
Ensaio	Variáveis		Biomassa (g/L)	Quitina (mg/g ⁻¹)	Quitosana (mg/g ⁻¹)
	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)			
1	28	140	3,3	395,34	13
2	35	140	9,5	375,00	16
3	28	150	4,0	475,00	14
4	35	150	12,6	483,20	150
5	31.5	145	9,1	255,55	123
6	31.5	145	9,6	218,75	104
7	31.5	145	8,9	294,73	136
8	31.5	145	9,7	250,00	140

3.4 Diagrama de Pareto para avaliação da influência das variáveis independentes agitação e temperatura na produção de quitina e quitosana por *Rhizopus microsporus*.

O diagrama de Pareto obtido com 95% de confiança ($p < 0,05$) demonstra que as variáveis independentes temperatura e agitação, assim como suas associações (1by2), foram significativas do ponto de vista estatístico sobre a produção de quitina, quitosana e biomassa por *Rhizopus microsporus* com os valores ultrapassando a linha p (Figura 1). A variável independente que mais teve influência sobre o aumento da produção de quitina (Figura 1A) quitosana (Figura 1B) e biomassa (Figura 1C) foi a temperatura, e os diagramas apresentaram valores positivos. No entanto, verifica-se que a associação entre as variáveis independentes (1by2 no Pareto) favorecem significativamente o aumento da produção de quitina em relação a quitosana.

Figura 1 – Diagrama de Pareto para avaliação da temperatura, e da agitação na produção de quitina e quitosana por *Rhizopus microsporus*: (A) Influência na produção de quitina e (B) Influência na produção de quitosana (C) Influência na produção da Biomassa.





3.5 Utilização de bagaço de malte, melão e caldo de tomate como meio para obtenção de bioemulsificante por *Rhizopus microsporus*

Rhizopus microsporus cultivado no meio contendo melão (4%), bagaço de malte (1,4%) e caldo de tomate (0,03%), na condição 4 do planejamento fatorial, foi capaz de secretar uma biomolécula com habilidade de emulsificar 52,17% do óleo queimado de motor e reduzir assim a tensão superficial para 43,5 mN/m. O rendimento do bioemulsificante bruto foi de 4,8 g/L. Resultados similares de emulsificação também foram obtidos utilizando o óleo de soja pós-fritura (52,08%). Em adição, a emulsão formada pelo bioemulsificante do *Rhizopus microsporus* utilizando óleo queimado de motor como substrato hidrofóbico, manteve sua propriedade emulsificante após 96h de formada nos ensaios realizados (Tabela 5).

De acordo com Willumsen e Karlson (1997), Kebbouche-Gana et al. (2009) e Rahman et al (2015) os bioemulsificantes são biomoléculas que apresentam significativas propriedades de emulsionar 50% de óleo em água e não provocam alterações significativas na redução da tensão superficial. Em adição, estudos recentes com espécies de *Rhizopus* sp (Pele et al 2018) demonstram a produção de bioemulsificante com valores similares aos obtidos a este estudo. Portanto, a partir dos dados obtidos neste trabalho, a amostra do *Rhizopus microsporus* demonstra ser um micro-organismo que possui capacidade de produzir uma biomolécula com características de um bioemulsificante em meio contendo resíduos industriais.

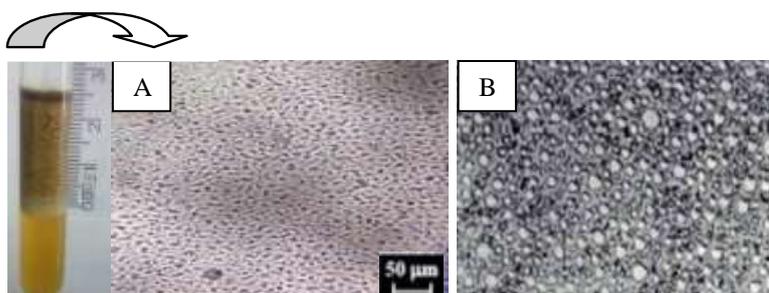
Tabela 5- Produção de bioemulsificante por *Rhizopus microsporus* avaliados pela tensão superficial (TS) e índice de emulsificação (IE₂₄)

Tensão superficial (mN/m)	Índice de emulsificação (IE ₂₄)			
	Tempo (h)	Óleo queimado de motor	Óleo de soja pós fritura	Óleo de soja
43,5 mN/m	24	52,17	52,08	42,22
	48	52,17	51,16	35,55
	72	50,00	41,86	28,88
	96	47,82	37,21	26,66

3.6 Caracterização da emulsão formada pelo bioemulsificante de *Rhizopus microsporus*

As características da emulsão formada pelo bioemulsificante produzido por *Rhizopus microsporus* após cultivo no meio contendo melaço (4%), bagaço de malte (1,4%) e caldo de tomate (0,03%) na condição 4 do planejamento fatorial, foi investigada por microscopia de luz. Os resultados demonstram a ocorrência da formação de emulsões estáveis, homogêneas, de tamanho pequeno com diâmetro médio de 10 µm e com características de emulsões do tipo água em óleo (A/O) (Figura 2A). Esses dados estão de acordo com Andrade (2009) que caracteriza as emulsões como do tipo A/O (Figura 2B) quando as gotículas de água (fase dispersa) estão suspensas na fase oleosa (contínua).

Figura 2 – Emulsão do tipo A/O formada pelo bioemulsificante de *Rhizopus microsporus* (A) comparado à emulsão tipo A/O (B) e emulsão tipo O/A, descritas pela literatura. Aumento 40X.



3.7 Potencial dispersante de petroderivado pelo bioemulsificante de *Rhizopus microsporus*

O bioemulsificante produzido por *Rhizopus microsporus* na condição 4 do planejamento fatorial, em meio contendo melaço (4%), bagaço de malte (1,4%) e caldo de tomate (0,03%), demonstrou atividade de espalhamento do óleo queimado de motor em água com dispersão correspondente a 29,06cm². Resultado similar de dispersão (32,1cm²) foi

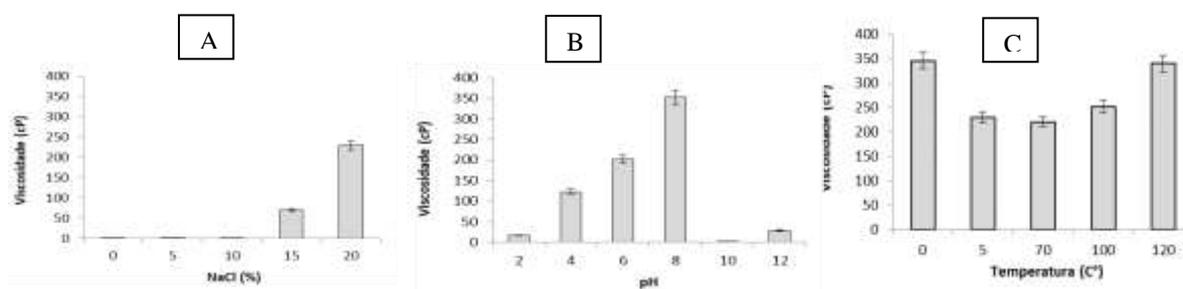
obtido pelo bioemulsificante produzido por *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295 (PELE et al 2018). Portanto, o resultado obtido neste trabalho, sugere a significativa capacidade de uso do bioemulsificante de *Rhizopus microsporus* como agente dispersante de petroderivado.

3.8 Efeito do bioemulsificante de *Rhizopus microsporus* na viscosidade de óleo queimado de motor

Bioprodutos produzidos a baixo custo e com potencial para reduzir a viscosidade de petroderivado vem sendo constantemente almejado pelas indústrias, em especial, em operações que envolvam a recuperação melhorada do óleo (MEOR) (SHIBULAL et al. 2018). Neste contexto, o bioemulsificante obtido pelo *Rhizopus microsporus* presente no líquido metabólico livre de células (condição 4 do planejamento fatorial) foi avaliado quanto ao seu efeito na redução da viscosidade de óleo queimado de motor, assim como na manutenção deste efeito após mudança de pH, temperatura e concentração de NaCl.

De acordo com os resultados obtidos, o bioemulsificante conseguiu reduzir a viscosidade do óleo queimado de motor de 150Cp para valores em torno de 70Cp e manteve sua atividade após adição de até 15% de NaCl (Figura 3A), como também reduziu a viscosidade para valores em torno de 30Cp quando submetido a pH ácido (pH 2 e 4) e alcalino (pH 10 e 12) (Figura 3B). Todas as temperaturas testadas aumentaram a viscosidade do óleo queimado de motor, respectivamente (Figura 3C).

Figura 3 – Estabilidade do bioemulsificante de *Rhizopus microsporus* na viscosidade de óleo queimado de motor: (A) Diferentes concentrações de NaCl, (B) Diferentes pH e Diferentes temperaturas (C)



4. CONCLUSÃO

A amostra testada de *Rhizopus microsporus* (UCP 1304) demonstrou ser um micro-organismo com uma habilidade especial em produzir simultaneamente quitosana e bioemulsificante nas condições testadas. Adicionalmente, a produção desses bioprodutos de interesse industrial através de processos biotecnológicos, possibilitou a utilização de uma formulação de um meio econômico constituído pelas fontes naturais renováveis: Bagaço de malte (1,4%), melação (4%), e caldo de tomate (0,03%), atendendo dessa forma aos requisitos essenciais da sustentabilidade ambiental. Ressalta-se as características de estabilidade, dispersão e viscosidade apresentada pelo Bioemulsificante, como aplicável, em processos biotecnológicos de interesse industrial.

REFERÊNCIAS

Andrade, G. H. (2009). Estudo da Espectroscopia na Região do Infraverme- lho Médio e Próximo para Previsão das Propriedades do Petróleo e Emulsão de Petróleo do Tipo Água em Óleo Estudo da Espectroscopia na Região do Infravermelho Médio e Próximo para Previsão das Propriedade, 125.

Andrade, R. F. S., Antunes, A. A., Lima, R. A., Araújo, H. W. C., Resende-Stoianoff, M. A., Franco, L. O., & Campos-Takaki, G. M. (2015). Enhanced Production of an Glycolipid Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP / WFCC1556 for Application in Dispersion and Removal of Petroderivatives. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences (IJCMAS)*, 4(7), 563–576.

Brar Kaur, S., Dhillon, G. S. D., & Soccol, C. R. (2014). *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals. (Book)*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8005-1>.

Cardoso, A., Lins, C. I. M., Dos Santos, E. R., Silva, M. C. F., Campos-Takaki, G. M. (2012). Microbial enhance of chitosan production by *Rhizopus arrhizus* using agroindustrial substrates. *Molecules*, 17(5), 4904–4914. <https://doi.org/10.3390/molecules17054904>.

Cooper, D.G. Biosurfactants. *Microbiol Sci.* 1986 May;3(5):145–149.

CyTA - Journal of Food, Volume 16, 2018 - Issue 1. Online: 23 Aug 2017.

Daylin, R. R., Rosileide, F. S. A., Goretti, S. S., Rodrigo, A. H., Milagre, A. P., Patricia, N., G.C. T. (2017). Promising biosurfactant produced by a new *Candida tropicalis* UCP 1613 strain using substrates from renewable-resources. *African Journal of Microbiology Research*, 11(23), 981–991. <https://doi.org/10.5897/AJMR2017.8486>.

Dos Santos, E. R., Da Silva, M. C. F., De Souza, P. M., Da Silva, A. C., De Paiva, S. C., Albuquerque, C. D. C., ... Campos-Takaki, G. M. (2013). Enhancement of *Cunninghamella*

elegans UCP/WFCC 0542 biomass and chitosan with amino acid supply. *Molecules*, 18(9). <https://doi.org/10.3390/molecules180910095>.

Fakas, S., Galiotou-Panayotou, M., Papanikolaou, S., Komaitis, M., & Aggelis, G. (2007). Compositional shifts in lipid fractions during lipid turnover in *Cunninghamella echinulata*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1321–1327. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.10.005>.

Fracchia, L., Cavallo, M., Martinotti, G. M., & Banat, I. M. (2012). Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications – Present Status and Future Potentials. In *Biomedical Science, Engineering and Technology*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/46845>.

Graziella, C. T., Julien, H., Marie, W. (2018). Production of *Aspergillus niger* biomass on sugarcane distillery wastewater: physiological aspects and potential for biodiesel production *Fungal Biology and Biotechnology*. v. 5. n. 1, p. 1.

Gupta, A., Prakash, J. (2015). Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 550–567. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.032>.

Jin Hu, K.; Yeung, K.W.; Ho, K.P.; Hu, J.L. (1999). Rapid extraction of high-quality chitosan from 611 mycelia of *Absidia glauca*. *J. Food Biochem.*23,187-196.

Jin, B., van Leeuwen, H.J., Patel, B., Yu, Q. (1998). Utilisation of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal α -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Bioresour. Technol.* 66(3), 201–206.

Kebbouche-Gana, S., Gana, M.L., Khemili, S., Fazouane-Naimi, F., Bouanane, N.A., Penninckx, M. ... (2009). Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36, 727–738.

Kuyukina, M.S.; Ivshina, I.B.; Makarov, S.O.; Litvinenko, L.V.; Cunningham, C.J.; Philip, J.C. ... (2005). Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. *Environ. Int.* 31, 155–161.

Leite, M. V., Stamford, T. C. M., Stamford-Arnaud, T. M., Lima, J. M. N., Silva, A. M., Okada, K., & Campos-Takaki, G. M. (2015). Conversion of agro-industrial wastes to chitosan production by *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 8(4).

Lima, R. A., Saconi, D. A., Campos-takaki, D. G. M., Montero, D. R. (2015). Optimized Submerged Batch Fermentation for Co-enzyme Q Production by *Candida glabrata* Using Renewable Substrates. *International Journal of Innovative Research in Engineering & Management (IJIREM)*, 2(5).

Lins, C.I.M.; Cardoso A.; Silva, M.C.F.; Batista, A.C L.; Jara, A.M. A.T.; Berger, L.R.R. ... (2010). Evaluation of chitin and chitosan by different extraction methods from mucorale an fungi biomass. *Asian Chitin Journal*, v. 6, n. 2.

Logesh, K.A., Thillaimaharani, K., Sharmila, M., Kalaiselvam, S. M. (2012). Raffi Production of chitosan from endolichenic fungi isolated from mangrove environment and its antagonistic activity *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2 (2), 140-143.

Margaret, C., Maimbolwa, B.S.C., Bawa Y., Vinod Diwan, M.D., Anna-Berit, R. A. (2003). Cultural childbirth. *Practices and beliefs in Zambi*, First published: 14 July. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2648.2003.02709.x>.

Md. Masirul Afroz, M.D., Nayeem Hasan, K.M. (2017). *Prottoy Shariar, Nafisa Islam, Fifth International Conference on Chemical Engineering (ICChE)*. A Comparative study for extraction and characterization of chitosan from local fungal sources and shrimp.

Montero-Rodríguez, D., Andrade Rosileide, F. S., Lima, R. A., Silva, G. K. B., Rubio-Ribeaux, D., Silva, T. A., Campos-Takaki, G. M. (2016). *Conversion of agro-industrial wastes by serratia marcescens UCP/WFCC 1549 into lipids suitable for biodiesel production. Chemical Engineering Transactions* (Vol. 49). <https://doi.org/10.3303/CET1649052>.

Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y., Imanaka, T. ... (1993). A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *Journal of Bacteriology*, 175(20), 6459–6466. <https://doi.org/10.1128/jb.175.20.6459-6466.1993>.

Pele, M. A., Montero-rodriguez, D., Rubio-ribeaux, D., Souza, A. F., Luna, M. A. C., Santiago, M. F., ... Campos-takaki, G. M. (2018). Development and improved selected markers to biosurfactant and bioemulsifier production by *Rhizopus* strains isolated from Caatinga soil, 17(6), 150–157. <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16230>.

Pia, A., Willumsen, U. K. (1996). *Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifier*. Department of Marine Ecology and Microbiology National Environmental Research Institute Roskilde Denmark.

Pochanavanich, P., Suntornsuk, W. *Lett. Appl. Microbiol.*, 35, 17, (2002).

Shells, Bangladesh University of Engineering & Technology Dhaka, Bangladesh, 2017.

Shibulal, B.I.J.I. (2018). Analysis of Bacterial Diversity in Different Heavy Oil Wells of a Reservoir in South Oman with Alkaline pH. *Scientifica*.

Souza, A. F., Rodriguez, D. M., Ribeaux, D. R., Luna, M. A. C., Lima e Silva, T. A., Silva Andrade, R. F. ... (2016). Waste soybean oil and corn steep liquor as economic substrates for bioemulsifier and biodiesel production by *Candida lipolytica* UCP 0998. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10). <https://doi.org/10.3390/ijms17101608>.

Stamford, T. C. M., Stamford, T. L. M., Stamford, N. P., Neto, B. D. B., & De Campos-Takaki, G. M. (2007). Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(1). <https://doi.org/10.2225/vol10-issue5-fulltext-1>.

Streit, F., Koch, F., Laranjeira, M.C.M., Ninow, J.L. (2009). Production of fungal chitosan in liquid cultivation using apple pomace as substrate. *Brazil J. Microbiol* 40:20-25.

Taiana Denardi-Souza, Kelly Cristina Massarolo, Sabina M Tralamazza & Eliana Badiale-Furlong (2018) Monitoring of fungal biomass changed by *Rhizopus oryzae* in relation to amino acid and essential fatty acids profile in soybean meal, wheat and rice, *CyTA - Journal of Food*, 16:1, 156-164, DOI: 10.1080/19476337.2017.1359676 To link to this article: <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1359676>

Willumsen, P. A., Karlson, U. (1997). Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*, 7(5), 415–423. <https://doi.org/10.1007/BF00056425>.

Zargar, V., Asghari, M., & Dashti, A. (2015). A Review on Chitin and Chitosan Polymers : Structure , Chemistry , Solubility , Derivatives , and Applications, (0), 1–24. <https://doi.org/10.1002/cben.201400025>.

CONCLUSÕES GERAIS

- *Rhizopus microsporus* (UCP 1304) demonstrou habilidade para crescer em meio contendo resíduos agroindustriais;
- *R.microsporus* possui potencial para produzir simultaneamente quitosana e bioemulsificante;
- A partir deste estudo, foi formulado um novo renovável meio para produção de biopolímero e biomolécula de interesse industrial;
- O bioemulsificante produzido possui características importantes para aplicação na indústria do petróleo.